Biochemischer und molekularbiologischer Nachweis der RNA-abhängigen DNA-Polymerase bei Mycosis fungoides-Patienten und T-Zell-Leukämien bei Kindern

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Med. Maria Georgieva - Schippel

geb. am 05.11.1958 in Sofia

Dekan: Prof.Dr.sc.med. H. David

Gutachter:
1. Prof. Dr. sc. med. S. Rosenthal
2. Prof. Dr. sc. med. G. Richter
3. Prof. Dr. sc. med Albrecht-Nebe

Berlin, den 22. 07. 1985

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immune depression syndrome (erworbenes immuno-depressives Syndrom)
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMML	akute myelomonozytäre Leukämie
AMV	avian myeloblastosis virus (Vögel-Myeloblastose-Virus)
ATL	adulte(s) T-Zell-Leukämie/Lymphom
ATLV	adultes T-Zell-Leukämie/Lymphom-Virus
BLV	bovine leukemia virus (Rinder-Leukämie-Virus)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
D-Aktivität	poly dA-abhängige Aktivität, entspricht den DNA-Polymerasen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpT_9	desoxy-polymerisiertes Thymidin, 9 Basen
FeLV	feline leukemia virus (Katzen-Leukämie-Virus)
HTLV	humanes-T-Zell-Leukämie/Lymphom-Virus
^{3}H-TTP	Tritium-Thymidintriphosphat
M.f.	Mycosis fungoides
MoLV	moloney leukemia virus (Affen-Leukämie-Virus)
R-Aktivität	poly rA-abhängige Aktivität, entspricht der RNA-abhängigen DNA-Polymerase oder Revertase
RNA	Ribonucleinsäure
TCGF	T-Cell-Growth Factor (T-Zell-Wachstumsfaktor)
TMP	Thymidinmonophosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
ZKS	Zellkultursediment ≙ mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen
ZKÜ	Zellkulturüberstand ≙ 100000 g Sediment des Kulturüberstandes

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1.	Onkogene Viren	3
1.2.	HTLV-Typ C Retrovirus beim Menschen	4
1.3.	Verwandtschaft von HTLV mit BLV	7
1.4.	Bestand ein Zusammenhang zwischen HTLV und AIDS?	8
1.5.	Nachweisverfahren von Retroviren und Revertase für die Diagnostik	11
1.5.1.	Endogener Revertasetest	12
1.5.2.	Exogener Revertasetest	13
1.5.3.	Elektronenmikroskopie	14
1.5.4.	Dichtegradientenzentrifugation	14
1.5.5.	Indirekte Methoden - serologischer Nachweis einer Retrovirus-Infektion	14
1.6.	Aufgabenstellung	16
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Probanden	22
2.2.	Leukozytengewinnung und Kultivierung	23
2.3.	Isolierung der virushaltigen mikrosomalen Fraktion	24
2.4.	Biochemischer Nachweis von "Revertase", DNA-Polymerase und terminaler Transferase	25
2.5.	Virusdichtegradient in Saccharose/TNE	26
2.6.	^{3}H-Uridin-Einbau und Dichtegradientenzentrifugation	27
2.7.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	28
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Revertaseaktivität in peripheren Leukozytenlysaten von Kontrollprobanden	29
3.1.1.	Ohne Kurzzeitkultivierung	29
3.1.2.	Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf den poly-rA-abhängigen Einbau bei den Kontrollprobanden	30

		Seite
3.2.	Revertaseaktivität in peripheren Leukozytenextrakten von adulten Patienten mit verschiedenen Leukämieformen, Mycosis fungoides und bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie ohne Kurzzeitkultivierung	30
3.3.	Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf den Revertasenachweis im 100000 g Sediment des Kulturüberstandes	36
3.4.	Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf den Revertasenachweis in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen	37
3.5.	Dichtegradientenzentrifugation von Zell-lysat	39
3.5.1.	bei Kontrollprobanden ohne/nach Kurzzeitkultivierung	39
3.5.2.	bei hyperzellulärer ALL vom T-Zelltyp ohne Kurzzeitkultivierung	44
3.5.3.	bei hyperzellulären T-Zell ALL nach Kurzzeitkultivierung	46
3.6.	^{3}H-Uridin-Einbau und Dichtegradientenzentrifugation	47
3.7.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	52
4.	Diskussion	52
4.1.	Ist die R-Aktivität Revertasespezifisch?	52
4.2.	Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf die Virusproduktion	55
4.3.	Aussagekraft des Verhältnisses R- zu D-Aktivität	56
4.4.	Dichtegradientenzentrifugation	58
4.5.	Sind die vorliegenden Ergebnisse für das Auftreten von Retroviren in Human-Geweben verdächtig?	58
5.	Literaturnachweis	60
6.	Anhang-Tabellen	66
	Thesen	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548910_0007

1. Einleitung

1.1. Onkogene Viren

Bei einer Reihe von tierischen Tumoren, darunter Sarkomen und Leukosen, konnte der Nachweis einer Virusätiologie erbracht werden. Es dominieren dabei RNA-Tumorviren (2,20, 21, 71, 72, 73, 78). Diese gehören, gemeinsam mit den Unterfamilien Spumavirinae und Lentivirinae, zur Familie der Retroviren (18, 50). Ihr Name leitet sich von einer charakteristischen Eigenschaft der virusspezifischen DNA-Polymerase ab, die eine geringere Matrizenspezifität als andere DNA-Polymerasen aufweist, und im Gegensatz zu diesen einsträngige RNA als Matrize akzeptiert und sofern ein Keim vorhanden ist, einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren in der Lage ist. Diese Synthese wird auch als umgekehrte (reverse) Transkription bezeichnet. 1964 wurde erstmalig die Vermutung ausgesprochen, daß in einer mit RNA-Tumorvirus infizierten Wirtszelle genetische Information der viralen RNA in DNA und zurück in virale RNA umgeschrieben wird (Schema 1). Die Partikel der Retroviren haben einen Durchmesser von 90-110 nm. Der Innenkörper (= Core) des Viruspartikels besteht aus Nukleoprotein und Kernkapsid.

Nachdem die Viruspartikel von der Zelle abgegeben worden sind, besitzen sie tatsächlich eine Hülle, die von der Zellmembran abstammt, in die jedoch viruskodierte Proteine eingelagert sind.

Die RNA-Tumorviren lassen sich elektronenoptisch, aufgrund von Unterschieden in ihrer Morphe in Typ A, B und C unterteilen. Bei den Typ C-Viren ist der Viruscore zentral gelagert. Bei tierischen Leukosen wurden vor allem Typ C-Partikel nachgewiesen. Die Viruspartikel bestehen aus 2,2 % RNA, 65 % Proteinen und 35 % Lipiden. Anhand der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation wurde eine charakteristische Dichte von 1,15 - 1,18 g/cm^3 bestimmt.

UNIV. LEIPZIG BIBL.

Das Genom des Virus besteht aus zwei identischen einsträngigen RNA-Molekülen, die bei 70 S sedimentieren. Werden sie jedoch getrennt, sedimentieren sie bei 35 S. Die virale RNA enthält an ihrem 3'-Ende eine Poly A-Sequenz, die aus über 200 Nukleotiden besteht. Die 5'-Enden der viralen Moleküle sind ebenfalls modifiziert; sie tragen die sogenannte "cap"-Struktur.

Aus den RNA-Tumorviren wurden bisher 7 - 8 viruskodierte Proteine isoliert: die RNA-abhängige DNA-Polymerase des pol-Gens, 4 Gruppen des gag-Gens, spezifische Antigene der Virusinnenkörpers, 2 Oberflächenantigene des env-Gens der Virushülle.

1.2. HTLV-Typ C-Retrovirus beim Menschen

Die bei Tieren nachgewiesene Auslösung von Leukämie durch exogene Retroviren (FeLV, MuLV, BLV), wird seit kurzem auch für einige Formen maligner T-Zell-Lymphome bzw. -Leukämien des Menschen (Mycosis fungoides u.a.) diskutiert. 1980 wurde von POIESZ et al. erstmalig über die Isolierung von Typ C-Retroviruspartikeln aus zwei lymphoiden T-Zell-Linien und peripheren Blutlymphozyten eines Patienten mit einem T-Zell-Lymphom, das sich auch an der Haut manifestierte, berichtet (67). Unabhängig von dieser Gruppe wurde aus Japan (31, 32, 45) ein analoger Befund mitgeteilt. 1977 wurde erstmalig das endemische Auftreten von T-Zell-Lymphomen/Leukämien in Südwestjapan beschrieben. Aus dem Lymphknoten einer Patientin mit einem ATL (adultem T-Zell-Lymphom) konnte eine kontinuierlich wachsende Linie leukämischer T-Zellen gezüchtet werden. ATLV und HTLV gehören zum gleichen Virustyp. Inzwischen wurden weltweit 33 HTLV-Proben von Patienten mit T-Zell-Lymphomen isoliert (88). Das sogenannte HTLV wurde bereits in 3 Subtypen unterteilt:

- HTLV-I (amerikanischer Patient),
- HTLV-II (Patient mit einer Haar-Zell-Leukämie) und
- HTLV-III (französische Patientin) oder
  HTLV I - non II (13, 25, 38, 79).

Das ATLV kommt in bestimmten endemischen Gebieten, Kyushu, Südjapan (5, 6) gehäuft vor. Es liegen aber auch Berichte aus Israel, Afrika und Europa über solche Fälle vor (17, 23). Die Patienten zeigen bestimmte gemeinsame Merkmale, es werden meist jüngere Menschen beiderlei Geschlechts betroffen, bei allen dominiert ein reifer T-Zell-Oberflächenphänotyp und eine Hyperkalzämie wird beobachtet.

Die von POIESZ et al. 1980 aus den HTLV-Zellinien isolierten Retroviruspartikel weisen einen Durchmesser von 100-110 nm auf und haben im [illegible] Saccharose-Gradienten eine Dichte von 1,16 g/ml. Aus den Viruspartikeln konnte eine 70 S RNA isoliert werden und die Viruslysate (Mg^{++} abhängig) zeigten die für Retroviren charakteristische RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität (47).

Intrazellulär wurden bisher keine Partikel nachgewiesen. Ähnliche Berichte liegen von YOSHIDA et al. (78), SARIN et al. (57), REITZ et al. (51, 52, 53), POPOVIC et al. (48) und MIYOSHI et al. (43) vor.

Eine Charakterisierung der Viren konnte erst vorgenommen werden, nachdem es gelang, die virusinfizierten Lymphozyten in vitro zu kultivieren. Hinsichtlich der Kultivierung der isolierten Lymphozyten wurden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben. MORGAN et al. (44) isolierte 1976 einen T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF). Mit seiner Hilfe können die T-Zellen zum Wachstum angeregt werden. Dieser Faktor wird vor allem von GALLO und Mitarbeitern benutzt. MIYOSHI et al. (43) berichten über eine Transmission des ATLV auf reife menschliche T-Zellen im Kokulturverfahren. Um die Transmission zu bewirken, werden Zellen von Neugeborenen (1×10^6/ml) entgegengesetzten Geschlechts als Empfängerzellen eingesetzt. Die T-Zellen konnten zwar ohne TCGF stimuliert werden, eine Kultivierung von ATL-Zellen in Anwesenheit von 5-Jodo-2'-Desoxyuridin in einer Konzentration von 50 µg/ml erbrachte eine deutliche Steigerung a) der Virusproduktion und b) Zellen

mit einem charakteristischen Oberflächenantigen (32). Die Seren von Patienten mit T-Zell-Lymphomen/Leukämien wurden auf Antikörper gegen das interne Hauptstrukturprotein p24 des HTLV untersucht (6, 31, 32, 33, 38, 54). In 1 - 5 % der Zellen der T-Zellreihe eines Patienten mit ATL wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz ein p19/p24-Antigen im Zytoplasma dargestellt (31). Dieses Antigen wurde in gesunden menschlichen lymphoiden Zellinien nicht gefunden und zeigte mit anderen viralen Antigenen, wie z.B. Herpes-simplex-Virus, Epstein Barr-Virus, Varizellen-Zoster-Virus, keine Kreuzreaktivität.

Antikörper gegen das p24-Antigen wurden bei allen 48 Patienten mit ATL und bei 32 von 40 Patienten mit malignen T-Zell-Lymphomen, sowie bei 26 % der normalen Probanden in ATL endemischen Arealen gefunden (32).

Von KALYANARAMAN et al. (35) wurde versucht zu klären, ob HTLV mit anderen Retroviren verwandt ist. Mittels Nukleinsäure-Hybridisierung und immunologischer Methoden konnte keine derartige Beziehung nachgewiesen werden. Das HTLV ist demnach ein neues Retrovirus. Da die p24-Antikörper spezifisch gegen das HTLV p24 und nicht gegen spezifische Determinanten gerichtet sind, zeigen die Antikörper gegen das HTLV dennoch eine spezifische Immunantwort des Menschen auf eine Retrovirusinfektion an.

Aufgrund epidemiologischer Studien diskutieren BLATTNER et al. (2, 3), ROBERT-GUROFF et al. (62), TAJIMA et al. (78) und SATO et al. (54) eine horizontale Übertragung des HTLV.

Zelluläre DNA peripherer Lymphozyten von ATL-Patienten wurde durch Restriktionsanalyse und Hybridisierung mit spezifischen DNA-Proben auf die Anwesenheit von ATLV-DNA getestet und mehrere provirale Banden wurden gefunden. Diese sprechen für verschiedene Integrationsorte des Provirus in das Wirtsgenom. Die DNA enthält einen bis [illegible] der jeweiligen

Patienten enthielten keine HTLV-DNA. Auch an den T-Lymphozyten der HTLV-Patienten wurde keine [illegible] gefunden (73). Diese Ergebnisse sprechen gegen die vertikale Übertragungsweise eines endogenen Virus (73).

HTLV infizierte Zellen exprimieren provirale Sequenzen in Form von RNA. Die virale RNA hat einen Anteil von 0,05-0,1 % an der zellulären cytoplasmatischen RNA. Dies ist für retrovirusinfizierte Zellen charakteristisch (48).

Die HTLV-DNA-Polymerase kann, wie bei allen Retroviren, RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribieren (47). Das HTLV-Enzym ist [illegible] bei Mg^{2+}- und nicht wie bei anderen RNA-Tumorviren von Primaten Mn^{2+}-abhängig. Polyribonukleotide sind für das HTLV-Enzym gute Matrizen. Das gilt in Übereinstimmung mit analogen Enzymen anderer RNA-Tumorviren, nicht nur für die poly rA/oligo dT, sondern auch für die poly rC/oligo dG. Die Einbauten mit der poly rC/oligo dG sind fast um das [illegible] höher, als die mit der poly rA/oligo dT, z.B. [illegible] gegenüber 614 pmol ^{3}H-TMP. (11, 73).

Die Molmasse des Enzyms beträgt [illegible] Dalton (11). Eine immunologische Kreuzreaktivität mit den Enzymen anderer RNA-Tumorviren konnte nicht gefunden werden.

1.3. Verwandtschaft von HTLV mit BLV

Oroszlan et al. (40) untersuchten 1982 die Aminosäuresequenz des HTLV-Strukturproteins p24 auf Homologien mit den p24-p30 Protein anderer Retroviren, obwohl weder immunologisch auf der Proteinebene, noch mittels molekularer Hybridisierung auf der Nukleinsäureebene, wie bereits angeführt, Verwandtschaftsbeziehungen [illegible] werden. Das HTLV p24 besitzt, gemeinsam mit den p24-p30 der anderen tierischen Typ C-Retroviren, die gleichen Aminosäuren im NH_2- und COOH-Terminus: NH_2-Prolin und COO^--Leucin.

Eine statistisch signifikante Homologie von Aminosäure-sequenzen wurde nur zwischen HTLV und BLV gefunden. Innerhalb einer Sequenz von 40 Aminosäuren des HTLV- und des BLV-p24 waren 9 Aminosäuren in einer nicht zusammenhängenden Folge positionell identisch.

1.4. Besteht ein Zusammenhang zwischen HTLV und AIDS?

Seit kurzem wird ein Zusammenhang zwischen dem HTLV und dem erworbenen (aquirierten) Immundefizienz-Syndrom (AIDS) diskutiert (4, 17, 25, 27, 42).

Dieses erworbene Syndrom wird durch hohe Infektanfälligkeit der Patienten gegenüber Erkrankungen, die normalerweise keine ernsthafte Schädigung des gesunden Organismus hervorrufen, wie z.B. Pneumonien durch Pneumocystis carinii und die Entwicklung von Kaposi's Sarkom, charakterisiert. Erste AIDS-Manifestationen sind seit 1981 bekannt. Die Erkrankung endet zu 70 % letal. Die Zahl der Fälle (1981-1983) stieg im Zeitraum zwischen 1981 bis 1983 auf 2755 (42). Von GALLO wird die Möglichkeit diskutiert, daß eine AIDS-Erkrankung durch einen HTLV hervorgerufen werden könnte, da beide Erkrankungen Ähnlichkeiten aufweisen:

- Übertragung horizontal auf hämatogenem Wege; größte AIDS-Gruppe bei Homosexuellen, aber auch bereits bei Frauen nach Kontakten mit bisexuellen Männern, Drogensüchtige nach intravenöser Drogenapplikation mit unsterilisierten Nadeln, haitianische Emigranten und hämophile Patienten.

- [illegible]

Erste AIDS-Erkrankungen wurden im Zusammenhang mit den T-Zellymphomen gesehen. Den Helfer-T-Zellen wird eine besondere Bedeutung zugesprochen. Sie aktivieren bestimmte Immunreaktionen, einschließlich die Antikörperproduktion von B-Zellen.

AIDS-Patienten zeigen eine Verschiebung bestimmter T-Zell-Subpopulationen: der Helfer- zu den Suppressor-T-Zellen. Bei normalen Probanden beträgt das Verhältnis der Helfer zu den Suppressorzellen 2:1. Bei AIDS ist die Zahl der Helfer-Zellen im Verhältnis zu den Killer-Suppressor-Zellen, ausgedrückt im Verhältnis OKT 4^{+}/OKT 8^{+} verringert und kann einen Quotienten von 0,2 erreichen (17).

- Wie bei anderen RNA-Tumorviren könnte auch beim HTLV mit einer, eventuell abgerufenen, immunsuppressiven Wirkung des Virus gerechnet werden.

ESSEX zeigte 1983 (17), daß das FeLV eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Zell-Antwort infizierter Katzen ausübt. DENNER wies 1982 nach, daß die Lymphoblastentransformation in vitro durch eine Reihe Retroviren gehemmt wird. Die hemmende Wirkung ist nicht spezifisch. Sowohl HTLV, als auch AIDS könnten durch ein immunsuppressives und leukämie-induziertes Virus hervorgerufen worden sein.

- Von drei AIDS-Patienten wurde ein HTLV-I isoliert. Die Anwesenheit von Antikörpern gegen das HTLV bei AIDS-Patienten wurde von mehreren Gruppen hervorgehoben (4, 17, 25, 27). Patienten mit AIDS zeigen auch einen hohen Antikörpertiter gegen das Zytomegalie-Virus und das Epstein-Barr-Virus (17). Für das Zytomegalie-Virus wird eine ursächliche Rolle in der Entwicklung des Kaposi Sarkoms bei Patienten afrikanischer Herkunft diskutiert. Der spezifische Indikator für eine Retrovirusinfektion ist die Anwesenheit eines (oder mehrerer) integrierten (r) proviralen (r) Genoms (-) in der chromosomalen DNA der Wirtszellen. GELMANN et al.(27) testeten 1983 frische periphere Blutleukozyten von AIDS-Patienten auf die Anwesenheit von HTLV-Provirus. Positive Ergebnisse wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung unter Einsatz der Restriktionsenzyme ECO-RI und Bam-H I bei zwei Patienten, die auch Antikörper gegen das HTLV aufwiesen, erhalten. Diese Experimente wurden zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Bei beiden Patienten konn-

[illegible] Sequenzen mehr gefunden werden. Die Autoren diskutieren eine Erscheinung nach dem Verlust der [illegible] Zellen als mögliche Ursache für die Befunde.

Bei einem [illegible] Patienten [illegible] mit [illegible] isolierten [illegible] et al. [illegible] ein Typ-C-Retrovirus, das eine Mg^{2+}-abhängige [illegible] aktivität, eine Dichte von 1,16 g/cm^3 [illegible] [illegible] ähnlich, aber nicht mit ihm identisch, d.h. es ist ein T-lymphotropes Retrovirus mit horizontaler Transmission. Die Patientin war außerdem serologisch positiv für das [illegible] Virus und das Herpes-simplex-Virus.

[illegible] et al. (14) isolierten [illegible] eine [illegible] [illegible] ähnlich, jedoch konnten keine Nukleinsäure-Sequenzähnlichkeiten festgestellt werden. Die Autoren schlußfolgerten daraus, daß die Differenzen auf eine entfernte [illegible]

* siehe [illegible]

[illegible] HTLV bei Patienten mit Immunmangelerscheinungen, z.B. Kinder mit [illegible] oder [illegible], die AIDS-ähnliche Erkrankungen aufweisen.

[illegible] sehen. Vor allem aber muß die AIDS-Ursache abgeklärt werden. Die eben diskutierten Daten lassen vermuten, daß AIDS durch HTLV oder eine HTLV-Variante hervorgerufen wird. Es [illegible] HTLV nur [illegible] Infektion von AIDS-Empfängerzellen und nicht die Ursache von AIDS darstellt.

1.6. [illegible] für die Diagnostik

Von TEMIN und BALTIMORE wurde 1970 (2, 70) eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase oder Reversase, [illegible] (E.C. [illegible])) in Viruspartikeln [illegible] gefunden. Sie ist für alle Retroviren charakteristisch. Dieses Enzym stellt [illegible] für virusinfizierte [illegible] einen spezifischen Marker dar.

Die aus Lymphozyten von Patienten mit [illegible] gereinigte Reversase zeigte ein Molekulargewicht von [illegible] Dalton (20). Das virale Enzym hat folgende [illegible] Eigenschaften:

1. Es benötigt für DNA-Synthese [illegible] die RNA als Matrize.
2. Das gereinigte Enzym transkribiert heteropolymere Abschnitte der viralen 70 S RNA.
3. Als Matrize können bei in vitro-Synthese [illegible], poly rA und poly [illegible] als künstliche [illegible] dT_{12} [illegible] effektiv.

[illegible] ren eingesetzt (11, 30, 67, 68). Der biochemische Nachweis der Reverstase ist an [illegible] gebunden:

- Enzym und Substrat müssen mittels Solubilisierung der Viren (Triton X-100, KCl u.a. [illegible]-Puffer) in räumlichen Kontakt gebracht werden.

- Für die [illegible] virale RNA (endogener Teil) oder [illegible] (exogener Teil) eingesetzt werden.

- [illegible] (exogener Teil) oder durch [illegible] (endogener Teil) geliefert wird.

- Divalente Kationen stimulieren die Reaktion: Mn^{2+} und/oder Mg^{2+}.

- Das pH-Optimum [illegible].
- Das Temperatur-Optimum der Reaktion ist bei den jeweiligen Viren [illegible].

Die [illegible] Reaktionsprodukte, die [illegible] oder einsträngige [illegible], [illegible] werden. [illegible] kann durch Antikörper gegen die [illegible] spezifisch gehemmt werden.

1.3.1. [illegible]

[illegible] et al. [illegible] gibt die [illegible] für die [illegible] von Retroviren an:

- Nachweis von RNA-Partikeln der Dichte 1,15-1,18 g/cm^3,
- Nachweis viraler 70 S RNA,
- Reverstaseaktivität.

[illegible]

Die Technik erfaßt den Nachweis eines Enzym-Templatkomplexes, der in Glyzerolgradienten bei 60-70 S sedimentiert. Die Prüfung der Enzym-Abhängigkeit des Komplexes und den Nachweis, daß alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate für die Reaktion notwendig sind, wobei das Substrat muß radioaktiv markiert sein.

Da der endogene Test sehr aufwendig ist und den Einsatz großer Mengen radioaktiver Substrate erfordert, kam er für unsere Aufgabenstellung nicht in Frage (Schema 2).

1.3.2. Exogener Reversetasetest

Beim exogenen Reversetasetest wird nicht die c-DNA-Bildung an der endogenen viralen RNA-Matrize gemessen, sondern eine exogene RNA-Matrize zugegeben, zumeist ein Polyribonukleotid.

Als synthetische Matrize mit Primer wählten wir poly (A)/oligo dT, die bevorzugt durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen und poly dA/oligo dT, die vorwiegend durch zelluläre DNA-Polymerasen abgelesen werden, ein. Zum Zweck der Lyse viraler Membranen werden die Proben in einem Medium solubilisiert, das u.a. das Detergens Triton X-100 und KCl enthält. Ein Aliquot dieses Lysates wird mit einem Reaktionsgemisch, welches in einem Puffer die Matrize poly rA/oligo dT, das Substrat ^{3}H-TTP, divalente Kationen und ein reduzierendes Agens (DTT oder Merkaptoethanol) enthält, gemischt und inkubiert.

Um die Absorption von ^{3}H-TTP zu erfassen (= 0-Wert) wird in den Kontrollwerten die Matrize mit [illegible] durch Wasser ersetzt. Nach der Inkubation wird die Reaktion mittels Säurefällung gestoppt, der Niederschlag auf Membranfilter abfiltriert und ungebundenes ^{3}H-TTP aus dem Filter herausgewaschen. Die Radioaktivitätsmessung im Szintillationsgerät ergibt die Einbauwerte in DPM (Schema 3).

Dieser Test ist zwar empfindlich, aber nicht so spezifisch, da [illegible] zelluläre DNA-Polymerasen ([illegible]) unter für sie [illegible] Bedingungen die Matrize poly rA [illegible] können.

1.5.3. Elektronenmikroskopie

Elektronenoptisch werden die RNA-Tumorviren in Typ A-, B- und C-Partikel eingeteilt. Typ C-Partikel unterscheiden sich von den anderen durch die konzentrische Lage des Nukleoids. Diese Partikel besitzen [illegible] Hülle, der Kern ist elektronendicht und hat einen Durchmesser von 80-110 nm. Gelegentlich wird eine [illegible] beschrieben, die den Kern [illegible]. [illegible] erfolgt durch [illegible] und [illegible] Partikel an der Zellmembran und an zytoplasmatischen [illegible]. [illegible] "budding" [illegible]. [illegible] und [illegible] [10] beschrieben bei [illegible] [illegible] als ein Typ C-Virus, einen [illegible]. [illegible] der [illegible] Viruspartikel im Zytoplasma [illegible]. Die Viren [illegible] sind häufig von Zelltrümmern umgeben, was auf eine Zelldegeneration zurückschließen läßt [58]. [illegible] wurde auch ein Typ C-Virus in Zellen [illegible] dargestellt (5,6,23-29,31,32,33,34,42,45,47,48,51,54). (siehe Kapitel 7. Ergebnisse).

1.5.4. Dichtegradientenzentrifugation

Der Nachweis, daß die Partikel [illegible] Aktivität [illegible], wird durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation im [illegible] erbracht. [illegible] 1,16-1,18 g/cm³.

1.5.5. Serologische Verfahren zum Nachweis einer Retrovirus-Infektion

Mit [illegible] können virusspezifische Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Zunächst werden die Antikörper

gegen das Hauptstrukturprotein des Virusinnenkörpers (p24, beim HTLV auch das p19) und gegen das größere der beiden Glykoproteine der Virushülle (gp 46 bzw. gp 51) diagnostisch ausgewertet. Als Antigene werden isolierte Viruspartikeln bzw. ein Zellhomogenisat des Zelltyps eingesetzt.

Die serologischen Methoden spielen in der Routinediagnostik der durch das BLV ausgelösten enzootischen Rinderleukose die Hauptrolle (92).

- Immunpräzipitation:
Beim Agargeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (110, 111) entsteht nach Antikörperbindung zwischen dem Antigen und dem Antikörper ein sichtbares Immunpräzipitat.

- ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)
Unter Verwendung von enzymmarkierten Antikörpern wird das Verhältnis von freien und an Antigen (Hapten) gebundenen Antikörpern durch Bestimmung der Aktivität am festphasengebundenen Antigen (Hapten) bestimmt.

- RIA (Radioimmunoassay)
Mit dem Radioimmunoassay erfolgt die quantitative Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern unter Verwendung von radioaktiv markierten Reaktionspartnern; dieses Verfahren ist empfindlicher als der ELISA.

- Komplementbindungsreaktion (CF-Test)
Hierbei werden Antigene oder Antikörper nachgewiesen, die bei der Immunreaktion ein Komplement binden. Als Indikator dienen sensibilisierte Schaferythrozyten, die bei der Wechselwirkung mit dem Komplement hämolysieren.

Speziell für das BLV werden Virusneutralisationstests, Synzytientest und Plaquereduktionstest angewandt. Sie beruhen auf der BLV-spezifischen Eigenschaft, daß die Antigene der Virushülle membranfusionierende Eigenschaften besitzen. Dabei induzieren virusinfizierte Zellen bei einer Kultivierung mit Monolayerzellen eine Synzytienbildung (80).

1.8. Aufgabenstellung

Die Leukosen sind durch eine irreversible Vermehrung der weißen Blutzellen gekennzeichnet, die medullär oder extramedullär lokalisiert sein können und die mit oder ohne Ausschwemmungen dieser Zellen ins periphere Blut verlaufen. Die von VIRCHOW geprägte Bezeichnung "Leukämie" (Weißblütigkeit) beruht auf der Beobachtung, daß sich beim Stehenlassen ungerinnbar gemachter Blutproben von Leukosekranken mit hohen peripheren Leukozytenzahlen, eine weiße Zellschicht über der roten Blutsäule absetzt (62, 86). Dabei wurden die Bezeichnung "Leukose" als Oberbegriff der Krankheit und die "Leukämie" zur Benennung der Krankheitserscheinung verwendet. Als ätiologische Faktoren für die Leukosen konnten bisher physikalische Noxen (z.B. ionisierende Strahlen) und chemische Noxen (z.B. Benzolexposition) gesichert werden. Jedoch kommt diesen nur für einen geringen Teil der Erkrankung eine ätiologische Bedeutung zu. Tierexperimente an Huhn, Maus, Katze, Rind, Schaf und Ziege zeigten, daß ein weiterer ätiologischer Faktor eine Infektion mit RNA-Tumorviren sein kann (72).

Ein Tier wird dadurch infiziert, daß die Viren in für sie empfängliche Zellen eindringen. Intrazellulär wird die virusspezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase aktiviert und synthetisiert an der viralen RNA doppelsträngige virale DNA. Diese wird in die DNA der Wirtszelle als Provirus-DNA eingebaut und stört in der weiteren Folge die normale Proliferation und Expression der Wirtszelle. Die Wirtszelle wird durch das integrierte Provirus-Genom in potentielle Tumorzellen transformiert. Aus einem exogenen genetischen Faktor, der genomischen Nukleinsäure des Virus, entsteht auf diese Weise ein endogener genetischer Faktor in das Wirtsgenom integrierte Provirus-DNA. Dieser Infektionsmodus ist für die enzootische Rinderleukose (eine B-Zell-Leukose), die Katzenleukose (T-Zell-Leukose) und einige Typen der Mäuseleukose (T- und B-Zell-Leukosen) bewiesen.

(Schema 1). Der Mechanismus der malignen Transformation ist für die Retroviren, die chronische Leukosen, wie z.B. sporadische Rinderleukosen (=BLV) hervorrufen, ungeklärt. Bei diesen RNA-Tumorviren sind spezifische Gene - Onkogene - die die maligne Transformation der Zellen bewirken, bisher nicht gefunden worden. Erste Hinweise für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen einem Retrovirus und einer Human-Leukose wurden von POIESZ et al. 1980 an Patienten mit einem T-Zell-Lymphom, u.a. mit Hautmanifestation, beschrieben (47). Kurz danach wurde aus kultiviertem Lymphommaterial eines Patienten ein Typ C-Virus (HTLV = Human-T-Zell Leukemia Virus) isoliert, welches [illegible] den Typ C-Retroviren bei Tieren aufweist ([illegible]). Diese Daten konnten an Patienten mit Lymphoma (adultes T-Zell-Lymphom = ATL) in Japan bestätigt werden. Inzwischen wurde das Virusgenom kloniert und die DNA sequenziert (SEIKI et al. 1983). Die DNA ist 9,032 Nukleotide lang. Die Anordnung der Gene, gag-pol-env von 5' nach 3', entspricht den Verhältnissen, wie sie bei allen RNA-Tumorviren bekannt sind.

Aus der DNA von Lymphomzellen von Patienten mit ATL konnten auch inkomplette Provirusgenome isoliert werden (79). Die T-Zell-Lymphome/Leukämien sind seltene Krankheitsbilder. Zu ihnen gehören Mycosis fungoides, adultes T-Zell-Lymphom/Leukämie, T-Zell-Leukämie bei Kindern.

Die Mycosis fungoides, ein kutanes T-Zell-Lymphom, ist eine maligne Krankheit mit [illegible] Zellinfiltration. Jährlich werden [illegible] Fälle pro 1 Million Einwohner registriert, vorwiegend zwischen dem [illegible] Lebensjahrzehnt. Die Ätiologie ist unbekannt. [illegible] T-Zonen sind befallen, fakultative Zytodiapedese atypischer lymphatischer Elemente aus dem befallenen Gewebe ins Blut, führt zu leukämoiden Reaktionen (Sezary-Syndrom). [illegible] [illegible] Antwort auf [illegible] unbekanntes Antigen, vielleicht sogar ein

onkogenen Virus, manifest wird.

Ein Drittel der Patienten erlitten früher schwere Infektionskrankheiten, eine Immunschwäche wird angenommen. Das klinische [illegible] wird in ein prämykotisches, ein plaque- oder infiltratives und ein Tumorstadium eingeteilt. Das Sezary-Syndrom, als leukämische Phase der Mycosis fungoides, weist bestimmte morphologische, zytogenetische und immunologische Besonderheiten auf. Im [illegible] der M.f. [illegible] ein- oder mehrkernige Riesenzellen, [illegible] Zellen, [illegible] mit [illegible] Kerneinfaltungen (=Lutzner-Zelle oder Sezary-Zelle). Die Histologie des Sezary-Syndroms zeigt [illegible] Infiltratmuster auf der Cutis. Diagnostisch wichtig ist [illegible], daß die Sezary-Zellen runder und ovaler sind mit eingekerbten Kernen.

Die [illegible] der M.f. beruht sich auf die Sezary-Zellen. [illegible] Zell-Kerne, die in [illegible] mit Verschlechterung der [illegible], die Sezary-Zellen sind entweder "echte" Tumorzellen oder Resultat einer persistierenden Immunstimulation, sie stellen meistens Helfer-T-Zellen dar. [illegible] T-Zellen [illegible], die [illegible] des [illegible] erfolgt auf [illegible] Organe durch [illegible] T-Zellen. Das [illegible] beim [illegible] der M.f. [illegible]. Beim Sezary-Syndrom [illegible]. Die Therapie richtet sich nach dem jeweiligen Stadium, von [illegible] bis zur [illegible] (V. [illegible]).

[illegible] In unseren Untersuchungen einbezogenes Krankheitsbild, jedoch nicht auf die Haut allein manifestiert, [illegible] den T-Zell-Erkrankungen zählend, ist die T-Zell-

Leukämie, die vorwiegend Kinder betrifft.

Die Gesamtzahl an Leukämien erkrankter Kinder (bis 14 Jahre) wird für die DDR mit   und für die BRD mit 1:20000 Erkrankungen angegeben. Im Kindesalter überwiegen die akuten Leukämien. Der Häufigkeitsgipfel der Altersverteilung liegt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr. Davon entfallen 80 - 75 % auf akute lymphatische Leukämien, sie sind die häufigste Form der kindlichen malignen Erkrankungen. Mit der Entdeckung von Oberflächenmarkern lymphoider Zellpopulationen wurden viele Versuche unternommen, Leukämien und Lymphome aufgrund ihrer Zelleigenschaften in B-, T- oder O-Typ zu klassifizieren. Durch die Therapie werden quantitative Veränderungen der B- und T-Zellen hervorgerufen, die Einfluß auf die immunologische Situation des Patienten haben, so z.B. korreliert die Immunglobulinkonzentration im Serum mit der Zahl der B-Zellen. Die ALL ist heterogen, ca. 4 % der Fälle gehören dem B-Typ an und sind damit extrem selten, ca 16 % gehören dem T-Typ an, für die meisten Formen aber können keine Oberflächenmerkmale für B- oder T-Zellen nachgewiesen werden.

Die malignen lymphoblastischen Lymphome mit leukämischem Verlauf gehören dem T-Zelltyp an und betreffen etwa 10-15 % der ALL-Patienten. Sie zeigen massive leukämische Infiltrationen (z.B. Mediastinaltumoren), eine schwache oder negative PAS-Reaktion, eine positive saure Phosphatase-Reaktion und eine schlechte Prognose.

Die Anfangssymptome sind oft uncharakteristisch, auffallende Blässe, Fieber, bakterielle Infektionen, später folgen Blutungen aus Nase und Zahnfleisch, petechiale Blutungen und flächenhafte Hämatome. Knochenschmerzen gehören zu den führenden Symptomen, sie können auch die einzigen Beschwerden sein, seltener sind Gelenkschwellungen. Bei Hirnbefall sind Erbrechen und Kopfschmerzen Zeichen des erhöhten Hirndrucks.

Häufige Infiltration der [illegible] treten [illegible], Abdominal- und Thoraxorganvergrößerungen auf, am meisten befallenen Organe sind Leber, Knochenmark, Milz, Niere und Lymphknoten (40, 62).

Die Diagnose einer ALL kann sicher nur aus der Zytomorphologie des Knochenmarks gestellt werden. Aleukämische Formen sind häufiger als leukämische, je nach Ausmaß der Beeinträchtigung der Hämatopoese finden sich eine Anämie und Thrombozytopenie, sowie Leukopenie oder Leukozytose mit relativer Lymphozytose. Die Überlebenschance, d.h. Remission, der Kinder hat sich infolge einer intensiven und konsequenten Therapie von 0 % in der Zeit um 1960, auf 70 % um 1976 entscheidend verlängert. Die Risiken der Therapie sind erheblich. Das größte Risiko sind Infektionen, vor allem neutropenische Enterokolitiden.

Da bisher die Diagnosestellung zumeist erst bei Organmanifestation erfolgt, ist die Erprobung von neuen diagnostischen Verfahren, die eine Vorverlegung des Diagnosezeitpunktes ermöglichen können, von großer medizinischer Wichtigkeit. Wenn sich die Virustheorie bestätigt, wäre es sicher richtig, eine Untersuchung der Eltern, Geschwister und Personen, die mit den Kindern engeren Kontakt haben, vorzuschlagen.

Eine Bestätigung der viralen Theorie wirft auch die Frage nach einem besonderen Infektionsschutz bei Risikogruppen auf. Bei der enzootischen Rinderleukose wird z.B. an der Entwicklung von Vakzinen gegen BLV gearbeitet. Für den Menschen sind solche Überlegungen noch offen, da zunächst überhaupt die Ätiologie gesichert werden muß.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, erstens, der "exogenen" Reverstranskriptase (RT) in Leukozytenlysaten von 11 Patienten, Erwachsenen und Kindern, mit akuter und chronischer Leukämie, zu bestimmen, zweitens, an Lymphozytenlysaten ausgewählter T-Zell-ALL und T-Zell-Lymphome ([illegible]

[illegible] zu prüfen, ob mit dem exogenen Reversasetest, mit und ohne Kurzzeitkultivierung, Hinweise für das Auftreten von RNA-Tumorviren erhalten werden können; drittens sollte anhand der Reversaseaktivität untersucht werden, ob durch die Kultivierung in Nabelschnurserum Bildung und Freisetzung [illegible] RNA-Tumorviren stimuliert werden und viertens, unter Einsatz [illegible] und molekularbiologischer Verfahren, wie Dichtegradientenzentrifugation und elektronenoptischer Aufnahmen, unter Zugrundelegung der ausführlichen Literatur zum HTLV/ATLV nach [illegible] Retroviren gesucht werden. In der ersten Etappe [illegible] im Rahmen einer medizinischen Diplomarbeit (32), wurde der exogene Reversasetest, der von KUBLER (56) zum Nachweis von BLV entwickelt und zur Frühdiagnose der EBL mit Erfolg angewendet worden war, für den Nachweis von Retrovirus-Aktivitäten in nichtkultivierten Lymphozyten[illegible] einer Gruppe von elf leukämischen Patienten [illegible].

In der zweiten Etappe wurde die Kurzzeitkultivierung einbezogen. Dabei wurden Kultivierungsbedingungen verwendet, die sich bei HTLV-infizierten T-Lymphozyten bewährt haben (Nabelschnurserum von Neugeborenen), eingesetzt. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau OA Dr.med. Schöntube (II. Kinderklinik Berlin-Buch) durchgeführt.

Bei Proben mit eindeutigem exogenen Reversasetest sollte versucht werden, Viruspartikel durch Dichtegradientenzentrifugation darzustellen. Für Retroviren sind Dichten von 1,16 g/cm^3 charakteristisch.

Elektronenoptische Aufnahmen können abschließend die Ergebnisse [illegible].

[illegible]

[illegible]

[illegible]

In einer zweiten Serie von Versuchen wandten wir den Re-[illegible] von T-Zell-Lymphomen und [illegible] Kinder an und ergänzten die Re-[illegible] wurden jeweils [illegible] gesunder Probanden [illegible]. Es wurden zwei Krankheitsgruppen [illegible] untersucht und miteinander verglichen.

Die erste Gruppe bestand aus drei erwachsenen Patienten mit dem klinischen Bild einer Mycosis fungoides, histologisch [illegible] als T-Zell-Lymphom bekannt, aus der Hautklinik der Charité, die zweite Gruppe bestand aus drei [illegible] der II. Kinderklinik des Klinikums Berlin-Buch, [illegible] (E., 32 J.) und eine Ärztin (S., 25 J.). In der Anamnese [illegible]

2.2. Leukozytengewinnung nach Kultivierung

Bei drei Patienten mit einer [illegible] wurden 80-100 ml Venenblut entnommen und sofort nach Zusatz der [illegible] [illegible] mit 50 ml 0,9 % NaCl-Lösung und 2 IE Heparin pro ml Blut verdünnt. Anschließend wurde das Blut nach der von BOYUM et al. (1968) beschriebenen Methode bei Zimmertemperatur aufgearbeitet (4). Das Blut wurde auf je 30 ml Ficoll-Visotrast 370-Lösung (Dichte = 1,077 [illegible] Ficoll) aufgeschichtet und mit der Zentrifuge T 52 (Zentrifugen Janetzki) 40 min. bei 1200 U/min und 20 °C zentrifugiert. Die Grenzschicht, in der die Leukozyten sedimentierten, wurde vorsichtig abgehoben und mit demselben Volumen PBS-Puffer (auf 1 Liter: 8000 mg NaCl, 200 mg KCl, 2896 mg $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$, 200 mg KH_2PO_4, 1000 mg Glukose, pH = 7,2-7,4) verdünnt und 10 min niedertourig bei 1200 U/min und 20 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in 1-2 ml RSB-Puffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM $Mg(Ac)_2$, pH = 7,4) gegeben und die Zellzahl nach der Hämolyse der Erythrozyten mit 3 % Essigsäure in Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:1000 in der Neubauer-Kammer bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde für das periphere Blut der Kontrollpersonen angewandt.

Die Lymphozyten der drei Patienten der Kinderklinik waren durch Leukapherese gewonnen und uns zur weiteren Bearbeitung freundlicherweise von Frau OA Dr.med. [illegible] (II. Kinderklinik Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt worden. Die Proben wurden im Zellseparator der Firma AMINCO (USA), Typ Celltrifuge, eingesetzt. Das Gerät ermöglicht einen kontinuierlichen extrakorporalen Kreislauf mittels peristaltischen Pumpen. Der Patient wird an diesen Kreislauf über einen arterio-venösen Shunt oder venovenös angeschlossen. Sein Blut wird in der Zentrifuge separiert. Die gewonnenen einzelnen Blutkomponenten, wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma können wahlweise eliminiert oder dem Patienten wieder zugeführt werden. Während des Verfah-

rens befinden sich 200-230 ml Blut in der Zentrifuge und im extrakorporalen Schlauchsystem bei einem Durchfluß von 15-20 ml/min. Die auf diese Art gewonnenen Leukozyten wurden mit 20 % Serum, 10 % DMSO und 70 % Hanks-Lösung oder RPMI-1640 versetzt und stufenweise von 0 °C auf -70 °C abgekühlt und in Stickstoff konserviert.

Beim Auftauen wurden die Ampullen mit 50 % Hanks-Lösung bei 42 °C im Wasserbad erwärmt. Dem eingefrorenen Zellgemisch wird im Eisbad 5 ml RPMI-1640 Medium zugegeben, geschüttelt und dann tropfenweise die 20 % Hanks-Lösung (pH = 7,2-7,4) zugeführt. Anschließend wird die Suspension bei 1200 U/min. 10 min lang bei 20 °C zentrifugiert und mit RPMI-1640 Medium gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Für die Kultivierung der Zellen (onkologisches Labor der II. Kinderklinik Berlin-Buch) wurde folgendes Zellkulturmedium (+RHF-) eingesetzt: 87,5 % RPMI-1640, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Glutamin, AB-Serum oder Neugeborenen-Nabelschnurserum, 1 % NEP und 0,5 % Antibiotika (Gemisch aus Penicillin und Streptomycin, bei Bedarf Gentamycin). Als Gesamtmenge wurden 5 ml Medium auf 1 ml Zellsuspension gegeben.

Der Mediumwechsel wurde nach folgendem Schema vorgenommen: am 1. Tag nach dem Beginn der Kultivierung, am 3.-4. Tag und, wenn die Zellen länger kultiviert wurden, am 6. Tag. Die Zellzahl pro Kulturflasche schwankte von 1,7 bis $2,5 \cdot 10^7$ Zellen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

2.2. Isolierung der virushaltigen mikrosomalen Fraktion

Die Isolierung der mikrosomalen Fraktion und die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 0-4 °C oder im Eisbad durchgeführt.

Leukozytensuspensionen in Kulturflüssigkeit wurden niedertourig bei 1000 U/min 10 min bei +4 °C zentrifugiert. Der

Zellkulturüberstand wurde bei 4 °C aufbewahrt. Die Zellsedimente wurden in 1-2 ml PBS-Puffer resuspendiert und danach die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde mittels mehrmaligen (bis zu 10mal) Frieren und Tauen in flüssigem Stickstoff die Zellmembran lysiert. Mikroskopische Kontrollen bestätigten die Zerstörung (>1 μm) der Zellen.

Die Zellysate wurden dann in der K24 (Kühlzentrifuge Janetzki) für 15 min bei 12000 U/min und 0 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in der Spinco Beckmann, Rotor SW 27, für 90 min (45 min) bei 25000 (30000) U/min und 0 °C zentrifugiert.

Das virushaltige Ultrazentrifugen-Sediment wurde in NDS-Puffer (15 % Glycerin; 4 mM $Mg(Ac)_2$; 50 mM Tris-HCl; 0,5 mM KCl; 0,2 % MET; 0,5 % Triton X-100; 2 mM DTT; pH=8,0) resuspendiert und für 30 min bei 0 °C stehengelassen, um die Viren zu lysieren.

2.4. Biochemischer Nachweis von "Reversetase", DNA-Polymerase und terminaler Transferase

Der in dieser Arbeit angewandte Reversetase-Test wurde 1976 am Bochumer Lehmann-Klinik vorgestellt (30). Der Test wurde von mir zur Bestimmung der Reversetaseaktivität von Lymphozytenlysaten zunächst etabliert und bei verschiedenen menschlichen Leukämieformen (ALL, AML, CMPL, CML, CLL) erwachsener Patienten durchgeführt (28).

Viruslysat (Punkt 3.), jeweils 10 μl, wurde mit 50 μl Reaktionsgemisch (25 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 2 μCi ^3H-TTP (spezifische Aktivität anfangs 15 Ci/mmol, später 40 Ci/mmol); 10 μl 40 mM MET, 2 mM $Mg(Ac)_2$, 0,5 mM $MnCl_2$) versetzt. Als Template-Primer-Hybride wurden je 0,005 OD

- poly rA/oligo dT für den Nachweis der viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase und
- poly dA/oligo dT für den Nachweis der zellulären DNA-Polymerasen eingesetzt.

Zur Bestimmung der zellulären terminalen Transferase wurden parallele Testansätze mit 5 µl dsT_8 (5 OD) mitgeführt. Die Proben wurden 60 min bei 35 °C im H_2O-Bad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 5 % TCA-Pyrophosphat-Lösung (50 g TCA, 5,5 g NaH_2PO_4, 11,2 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10\ H_2O$) in 20 min gestoppt, d.h. zur Fällung im Kühlraum stehengelassen. Der Niederschlag wurde über Membranfilter, Porenweite 0,45 µm, abgetrennt und ungebundenes ^3H-TTP mit 5 % TCA abgesaugt (je 4 bis 5 mal Röhrchen abgesaugt, anschließend die Absaugvorrichtung gespült). Die Filter wurden getrocknet und in Küvetten mit 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit (5 g/l PPO, 0,1 g/l POPOP) gemessen.

Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Flüssigkeits-Szintillationsmeßgerät "WALLACE" LKB. Aus den Mittelwerten der Einbauraten mit Matrize und den Kontrollwerten, anstelle der Matrize mit Kalb wurde H_2O pipettiert, bestimmten wir die Differenz. Aus den cpm-Differenzen errechneten wir den ^3H-TMP-Einbau in pmol pro 60 min Inkubation. Die Werte wurden auf 10^6 Zellen bezogen.

2.9. Virusdichtegradient in Saccharose/TNE

Ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein von viralen Partikeln ist ihre Dichtebestimmung. In einem linearen 20-60 % Saccharose-TNE-Gradienten-Retroviren vom Typ C sedimentieren im allgemeinen bei einer Dichte von 1,14-1,18 g/cm^3 (siehe Einleitung). Die Methode wurde von SIEKOF et al. 1971 beschrieben (7). Wir verwendeten anstelle von Tris-HCl den TNE-Puffer (0,01 M Tris-HCl, pH = 7,4, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA).

Nach der Ultrazentrifugation, wie bereits beschrieben, wurde ein virushaltiges Sediment gewonnen, welches in 1 ml TNE-Puffer aufgenommen und auf einen linear geschichteten 20-60 % Saccharose-TNE-Gradienten vorsichtig aufgetragen wurde. Der Gradient wurde über 22 h im Rotor SW 40 bei

12000 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Von oben nach unten (zu den dichteren Schichten hin) wurden 12 Fraktionen zu je 1 ml abgehebert und davon je 50 µl refraktometriert. Am Refraktometer konnte der Zuckergehalt in Prozent und dementsprechend in einer Tabelle als Zuckerdichte abgelesen werden.

Die Fraktionen wurden auf 10 ml mit TNE-Puffer verdünnt und 25 min bei 30000 U/min in der Spinco Ultrazentrifuge - Rotor SW 40/41 - zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Sedimente in je 50 µl RSB-Puffer gelöst und damit der Revertase- und der DNA-Polymerase-Test durchgeführt.

2.8. ^{3}H-Uridin-Einbau und Dichtegradientenzentrifugation

Die Methode des ^{3}H-Uridin-Einbaus beruht auf der Markierung der zellulären bzw. viralen RNA nach Kurzzeitkultivierung. Das ^{3}H-Uridin wird von der Zelle aufgenommen und intrazellulär zu den Triphosphaten phosphoryliert. Aus dem UTP wird das ^{3}H-UMP in die RNA eingebaut.

Lymphozytenextrakte eines Patienten der Kinderklinik (= N.F.) und eines Kontrollspenders (= G.) wurden für 24 h kurzzeitkultiviert. Anschließend wurde in das Medium je 250 µCi ^{3}H-Uridin pro 20 ml Kultur gegeben und für weitere 24 h die Zellen ohne Mediumwechsel weiter inkubiert.

Die Isolierung der mikrosomalen Fraktion erfolgte wie unter Punkt 3 beschrieben, wobei sowohl Zellkulturüberstand wie das Zellkultursediment für die Bestimmung benutzt wurden. Nach der Ultrazentrifugation wurden die virushaltigen Sedimente in je 1 ml TNE-Puffer resuspendiert, auf einen linearen 20-60 % Saccharose-TNE-Gradienten geschichtet und für 18 h bei 19000 U/min und 4 °C in der Spinco Ultrazentrifuge (Rotor SW 41) zentrifugiert.

Es folgten die Fraktionierung und die Refraktometrie wie beschrieben (Punkt 5).

In diesem Fall wurde aufgrund der geringen Ausbeute nur auch der Virusproduktion auf die Reverse- und DNA-Polymerase-Bestimmung verzichtet. Die 12 Fraktionen wurden mit 20 % TCA-Lösung im Verhältnis 1:20 gefällt, anschließend der Niederschlag mit 5 % TCA auf Membranfilter aufgetragen und die Radioaktivität der Filter im Szintillationsmeßgerät gemessen.

3.7. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Absicherung des Reversetestes wurden in mehreren Versuchsreihen die Variabilität der gefundenen Einbauwerte bestimmt. Die Standardabweichung der Einzelbestimmungen für die eigentliche Reverseenzymreaktion beträgt 10-15 % und für den gesamten Test, einschließlich der Kernzellkultivierung und der Virusisolierung 20-30 % des jeweiligen Mittelwertes, wenn die Versuchsbedingungen konstant gehalten wurden. Die Einordnung der Ergebnisse, Reverse-positiv bzw. Reverse-negativ, hängt von der Differenz zwischen Kontroll- und Einbauwert und der Standardabweichung der Einzelbestimmungen vom Mittelwert ab.

Die obere Toleranzgrenze für normalverteilte Stichproben wurde aus $n = \bar{x}\ 2\sigma$ bestimmt.

Für den Mittelwertvergleich, der je Eiergruppe jeweils drei Kontroll- und drei Meßwerte enthält, wurde der Signifikanztest nach WELCH angewandt. Dieser Test führt zu drei Entscheidungsmöglichkeiten:

1. Reverse-negativ,
2. Reverse-verdächtig, Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %,
3. Reverse-positiv, Irrtumswahrscheinlichkeit 1 %.

Die Berechnungen wurden nach den im Anhang angegebenen Formeln durchgeführt (Tabelle 2).

4. Ergebnisse

Das Untersuchungsmaterial, insgesamt 13 [illegible], war sehr heterogen und umfaßte [illegible] mit sehr verschiedenen Krankheitsbildern.

- 34 -

I. Serie (Klinikum Berlin-Buch-III)

CML	2 Erwachsene
CLL	3 Erwachsene
Panmyelophthise	1 Jugendlicher
ALL	1 Kind

II. Serie (Hautklinik der Charité und II. Kinderklinik des Klinikums Berlin-Buch)

Mycosis fungoides	1 Erwachsener
T-Zell-ALL	3 Kinder

Die Hauptbedingung war, daß das Zellmaterial von unbehandelten Patienten stammte.

Eine geschlechtsspezifische Wertung war nach den Ergebnissen der ersten Serie nicht erforderlich und blieb aus diesem Grunde in der II. Serie unberücksichtigt.

3.1. Reverstaseaktivität in peripheren Leukozytenlysaten von Kontrollprobanden

3.1.1. Ohne Kompartimentierung

Von zwei Gruppen zufällig ausgewählter normaler Probanden, 6 Medizinstudenten (1980) und 5 Probanden (1983) wurden periphere Leukozyten gewonnen, Lysate hergestellt und das mikrosomale Sediment nach Lyse (siehe Material und Methoden) im exogenen Reverstasetest geprüft.

Der poly-r(A)-oligo(dT)-abhängige Einbau von ^{3}H-TTP betrug zwischen 0 und 0,38 pmol ^{3}H-dTMP/10^{8} Zellen in 60 min gemittelt und in der mikrosomalen Fraktion der Zellen. Ein Proband der Studentengruppe zeigte einen auffällig hohen Einbau von 1,35 pmol. Von ihm wurden Zellextrakte weiter untersucht (siehe Abschnitt 9).

Nach Berechnung des Mittelwertes und der Streubreite wurde eine obere Grenze für den unspezifischen sogenannten "normalen" poly-r(A)-oligo(dT)-abhängigen Einbau von 0,44 pmol ^{3}H-TMP/10^{8}

Zellen festgelegt. Dieser Grenzwert wurde durch die Resultate der zweiten Gruppe 1983 bestätigt und nicht überschritten (siehe Abb. 1).

3.1.3. Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf den poly(A)-abhängigen Einbau bei Kontrollprobanden

Um die Normalwerte der beiden Kontrollgruppen mit den Patientenergebnissen vergleichen zu können, deren Zellen, um eine etwaige Virusproduktion zu stimulieren, einer Kurzzeitkultivierung unterzogen worden waren, wurden periphere Leukozyten der 5 Kontrollprobanden der zweiten Serie gleichfalls kurzzeitig kultiviert.

Alle Proben, bei [illegible] von T_0, zeigten einen Abfall der RT-Aktivität nach 3d und 7d Kultivierung, sowohl im 100000 g Sediment des Kulturüberstandes, als auch in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen. Der Grenzwert des ^{3}H-TMP-Einbaus von 0,44 pmol wurde nur von einer Probe (n = 20) geringgradig (0,46 bei T_0) überschritten. (siehe Abb. 1 und 2 und Tabelle 1 und 4).

3.2. Reversetaseaktivität in peripheren Leukozytenextrakten von adulten Patienten mit verschiedenen Leukoseformen, Mycosis fungoides und bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie ohne Kurzzeitkultivierung

Der an menschlichen Leukosen optimierte Reversetasetest wurde an 6 Leukosepatienten mit CML, CLL, Panmyelophthise und einem Kind mit einer ALL aus der Patientengruppe des Klinikum-Berlin-Buch 1982 (= 1. Serie), an 3 kutanen T-Zell-Lymphomen (Mycosis fungoides) aus der Hautklinik der Charité und drei Patienten mit einer hyperzellulären ALL, zwei davon vom T-Zelltyp, der II. Kinderklinik Berlin-Buch (= 2. Serie) durchgeführt.

Bei zwei Patienten mit einer CML lagen die poly rA-abhängigen Einbauraten (oder RT-Aktivität) bei 1,2 bzw. 12,7 pmol TMP/10^9 Zellen (poly rA-abhängiger Einbau oder RT-Aktivität:

2,3 bzw. 17,4 pmol TTP/10^8 Zellen). Nach Abzug des aufgetretenen dT-abhängigen Einbaus bzw. T-Aktivität von 0,12 bzw. 10,1 pmol blieb die R-Aktivität immer noch erhöht. Das Verhältnis der Einbauten rA zu dA betrug übereinstimmend 1:1,5 bzw. 1:1,4. Das Ergebnis der R-Aktivität in der ALL-Gruppe (3 Patienten) beträgt jeweils 0,14-0,84 und 0,10 pMol ^{3}H-TTP/10^8 Zellen (D-Aktivität: 0,75; 11,10 und 0,55). Das Verhältnis von der R- zur D-Aktivität beträgt jeweils 1:5,3; 1:1,17 und 1:5,4.

Aufgrund der niedrigen peripheren Leukozytenzahlen wurden bei den Patienten mit einer Panmyelophthise Zellen aus dem Knochenmark entnommen und auf die Revertase-Aktivität geprüft. Der poly rA-abhängige Einbau beträgt 0,20, der poly dA-abhängige Einbau 6,0 pmol ^{3}H-TTP/10^8 Zellen, womit die Anwesenheit von Revertase nahezu ausgeschlossen ist.

Untersucht wurde auch eine Patientin mit einer ALL aus der I. Kinderklinik Berlin-Buch. Sie wies verhältnismäßig hohe R- und D-Aktivitäten (8,0 bzw. 103 pmol) auf.

Die "Revertase-" und DNA-Polymerase-Aktivitäten einer Kurzzeitkultivierung von den Patienten mit einer Mycosis fungoides (kutanes T-Zell-Lymphom) wurden in einem Fall (L.R.) nicht bestimmt. Dagegen betragen die poly rA-abhängigen Einbauten beim Patienten A.S. 25,0 pmol/10^8 Zellen. Die Patientin D.V. zeigt einen poly rA-abhängigen Einbau von 22,0 pmol/10^8 Zellen auf. Bei beiden Patienten ist das R:D-Verhältnis zugunsten der Revertase verschoben.

Wie bereits erwähnt, standen uns von drei Patienten eingefrorenes Zellmaterial, welches durch Leukopherese gewonnen wurde, für die Enzymbestimmung zur Verfügung. Von einem Kind (D.H.) erhielten wir parallel zu den Leukopherese-Leukozyten auch frische Liquorzellen als das Kind im Rezidiv erneut stationär aufgenommen wurde. Die Einbauraten waren so gering, daß sie in unserer Auswertung nicht mit einbezogen wurden (Abb. 13 und 14).

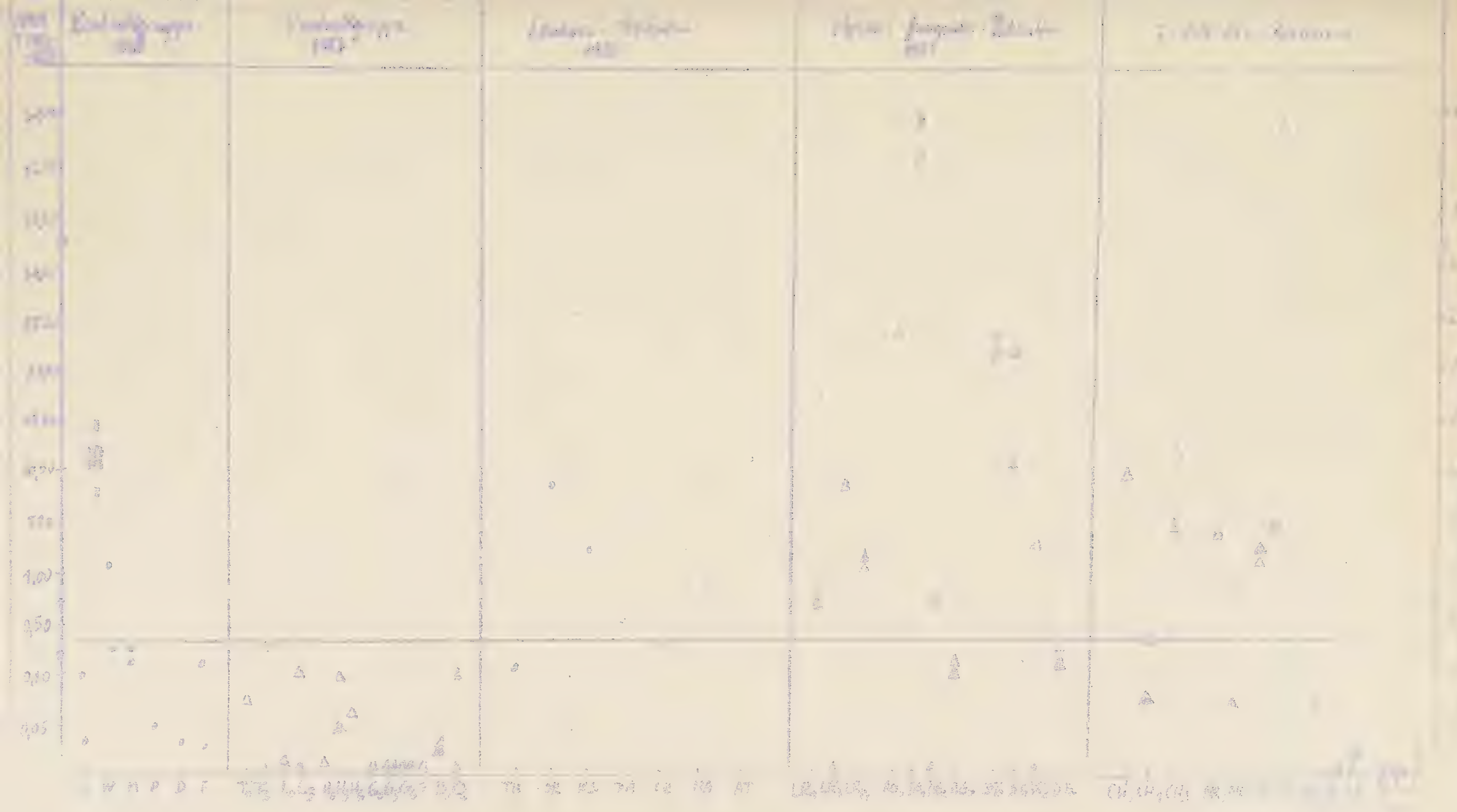
Der Patient H.W. mit einer hyperzellulären ALL, immunologisch dem T-Zelltyp zugeordnet, zeigte FA-abhängige Einbauten von 4,04 pMol/10^8 Zellen, der Patient H.H. mit ähnlichem Krankheitsbild dagegen 15 pMol/10^8 Zellen. Bei beiden Patienten ist das Verhältnis der FA- zur D-Aktivität annähernd gleich. Nach Abzug der T-Aktivitäten von der Gesamtaktivität bleibt bei beiden Patienten eine Differenz von 3,9 bzw. 11 pMol/10^8 Zellen als Zeichen der [illegible]tivität in pH2 signifikant erhöht (Tab. 2, 3, 5, 6).

Tabelle [illegible] Reverstaseaktivität in pmol ^{3}H-TTP/10^{6} Zellen [illegible] Patienten mit [illegible] und [illegible] Kontrollprobanden [illegible] von 3 Patienten mit einer [illegible] der II. Kinderklinik [illegible] sowie 3 [illegible] Patienten mit einer [illegible] und 5 Kontrollprobanden

a = [illegible]
b = [illegible]
c = [illegible]

Name	Diagnose	[illegible] Zellzahl	DNA Polymerase	Reverstase	[illegible]	[illegible] Verhältnis	[illegible]	Reverstase positiv +, Reverstase verdächtig (+), Reverstase negativ −	Bemerkungen
S.W.	ALL	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			Kind
K.S.	CLL	10,50	0,75	0,14	0	1:5,3			Erwachsene
D.A.	CLL	43,00	11,15	0,54	0,90	1:27,0			
[illegible]	CLL	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			
[illegible]	CML	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]			
A.T.	CML	0,23	17,40	12,70	10,50	1:1,4			
[illegible]	[illegible] sphthisa	0,21	9,00	0,20	0	1:32,0			Knochenmarkprobe
N.R.	T-ALL	2,50	6,66	4,04	0,13	1:1,6		+	Kind
[illegible]	T-ALL	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]
D B I	T-ALL	0,50	4,25	0,08	0,10	1:27,0		−	Kind
II	Rezidiv	15,50	0,61	(+)	0,01	1:25,0		−	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]

Nr.	Diagnose	[illegible]	DNA Polymerase	[illegible]	Terminale Transferase	[illegible]	[illegible]	positiv + verdächtig (+) negativ -	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	10,00	1:1,1	(+)		[illegible]
[illegible]	[illegible]	1,50	3,40	0,075	0	1:44,0	-		
		3,72	0,82	0,17	0	1:6,1	-		
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	1:13,0	-		
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	(+)		
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	-		
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	1:4,0	-		
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	-		
		[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	-		
[illegible]	[illegible]	3,07	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	-		
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,00	[illegible]	[illegible]		
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0,07	0,01	1:2,1	-		
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	1:37,0	-		
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1:50,0	-		
	[illegible]	[illegible]	0	0	0	0	-		
	[illegible]	[illegible]	0	0	0	0	-		

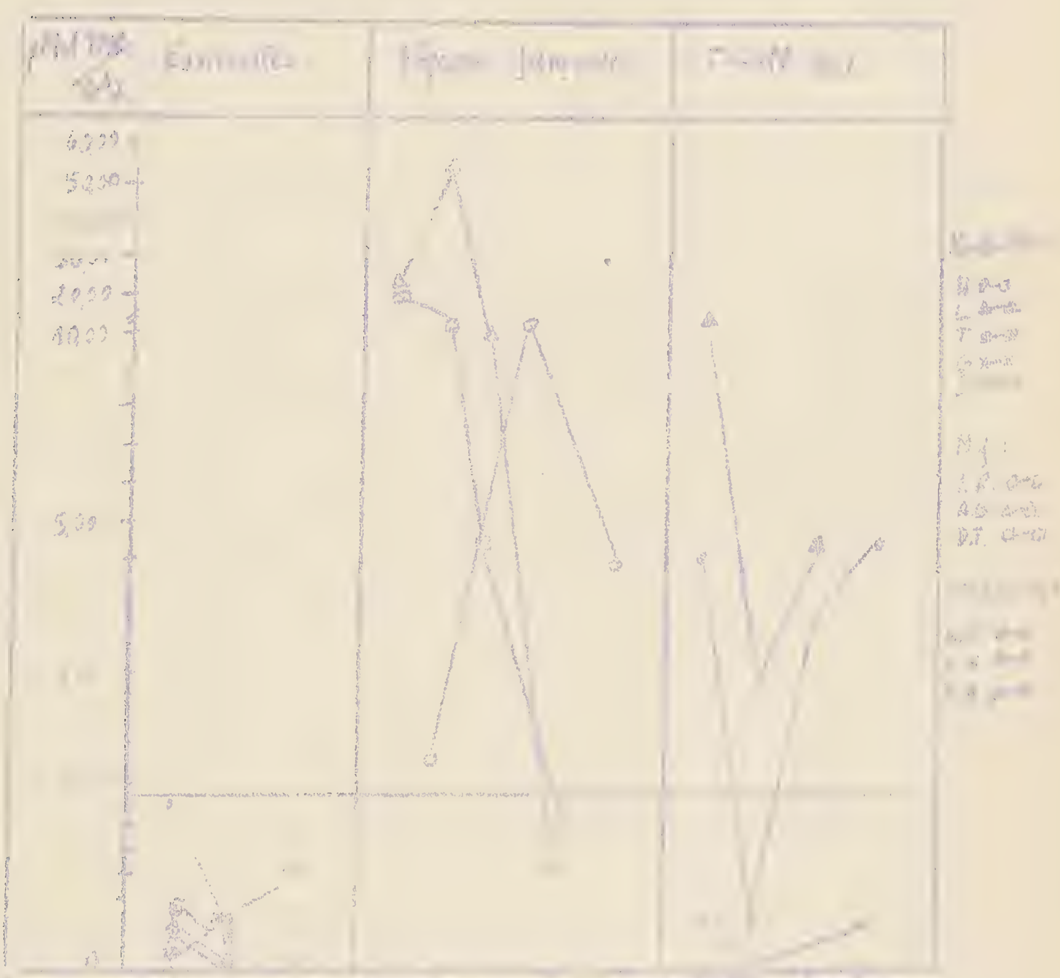


3.3. Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf den Reverttase-Nachweis im 100 000 g Sediment des Kulturüberstandes

Die Kurzzeitkultivierung peripherer Leukozyten von drei Mycosis fungoides- und drei hyperzellulären ALL-Patienten erfolgte ohne zusätzliche Stimulation durch Mitogene. Die Zellen wurden in 10 % Kälberfetalserum von Hauptkulturen und Frühpassagen kultiviert. Die Reverttase-, DNA-Polymerase- und terminale Transferase-Aktivitäten wurden parallel im 100 000 g Sediment und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen geprüft. Das Verhalten des poly rA-abhängigen Einbaus (= "Reverttaseaktivität") in den jeweiligen Fraktionen wurde am ersten, zweiten (bzw. dritten) und sechsten (bzw. siebenten) Tag analysiert. (Tabellen 4, 5, 6). Die Enzymaktivität der Mycosis fungoides-Patienten verhält sich im 100 000 g Sediment wie das der beiden T-Zell-ALL-Patienten. (Abb. 8, 9, 10, 11)

Zwei der M.f.-Patienten (A.G. und B.T.) zeigen nach 2d einen leichten bzw. keinen Anstieg der R-Aktivität, die nach 2- und 7d Kultur unter der Normalgrenze abfällt. Patientin L.H. zeigte konstant hohe R-Aktivitäten mit einem gleichen, aber verschiedenen Anstieg und Abfall der R-Aktivität. (Abb. 8). Die hyperzellulären ALL-Patienten vom T-Zelltyp zeigen bereits ohne Kultivierung (siehe Punkt 2) hohe Einbauwerte. Sie fallen nach einem Tag steil ab, um nach drei Tagen wieder anzusteigen. Insgesamt beobachten wir eine hohe R-Aktivität in beiden Krankheitsgruppen, die nach Kurzzeitkultivierung nicht den Anfangswert der nichtkultivierten Zellen übersteigt. (Tabellen 1- 4).

Tabelle: Reverstaseaktivität im 100 000 g Sediment des Kulturüberstandes von Leukozyten nach Kurzzeitkultivierung bei 5 Kontrollprobanden, 3 Patienten mit T-Zell-Lymphom (Mycosis fungoides) und 3 Patienten mit T-Zell-ALL.



3.4. Einfluß der [illegible] Nachweismethode in der mikroskopischen Prüfung der kultivierten Zellen

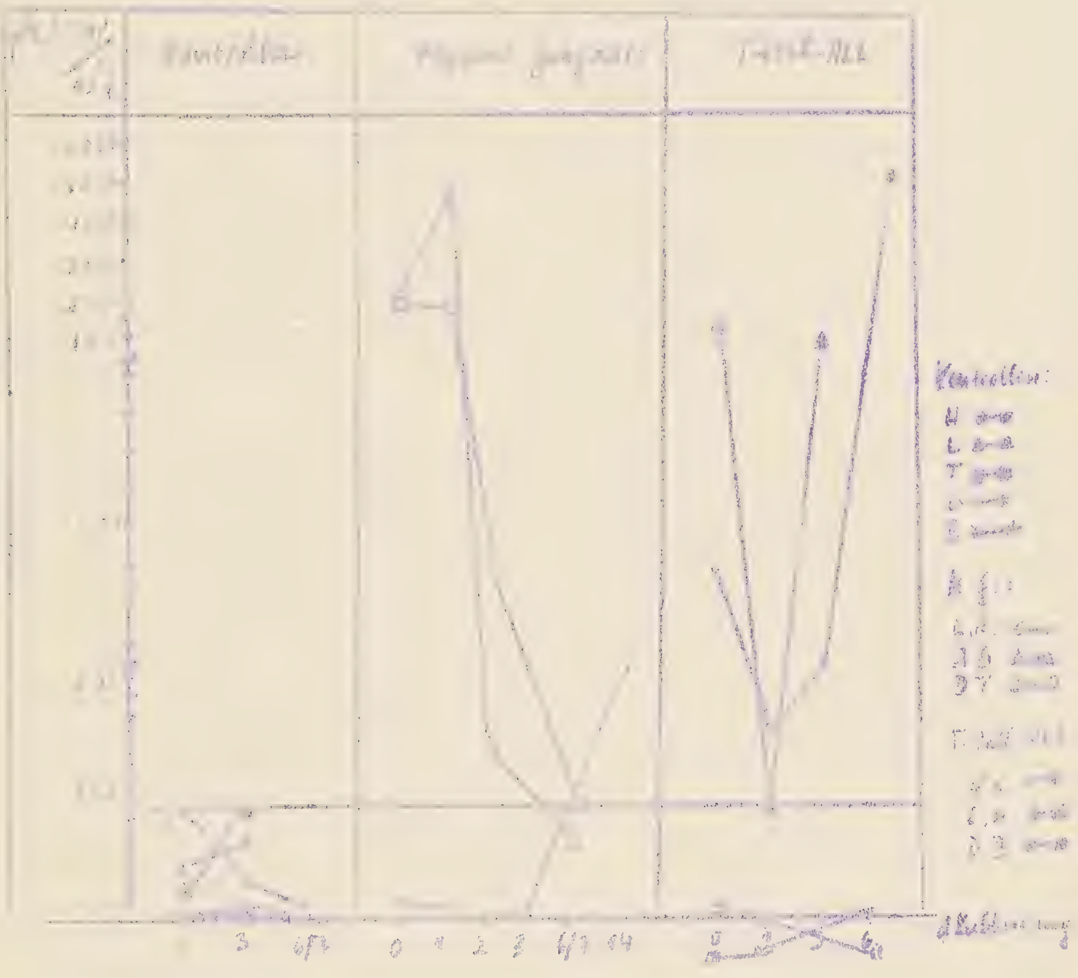
Erwartungsgemäß werden bei Zellkultivierung die freigesetzten Viren im Zellkulturüberstand [illegible] wurde, sofern im Zellkultur-Überstand vorhanden, auch im Zellsediment gemessen. Nach längerer Kultivierungsdauer war die Reversetranskriptase ([illegible]) meist höher als im [illegible] ([illegible]).

Der poly rA-abhängige Einbau verhält sich im 100 000 g Sediment des Kulturüberstandes und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen von Mycosis fungoides Patienten gleich. Die Ausgangswerte, ohne Kultivierung, sind, außer bei Patientin L.R. (nicht gemessen), viel höher als in der Sieben-Tage-Kultur.

Die Reverse Transkriptase bei den T-Zell-ALL-Kindern fällt von stark erhöhtem Einbau zu Beginn der Kurzzeitkultivierung auf Grenzwerte bzw. nicht erhöhte Werte ab, um nach drei bzw. sechs Tagen wieder anzusteigen. Der Anfangswert wird, mit Ausnahme von M.R., nicht überschritten.

Das Verhalten der Enzymaktivitäten in dem 100 000 g Sediment und in der mikrosomalen Fraktion der Zellen von Patient D.H. bestätigen die Schwankungen im Kultivierungsverlauf. Falls die hohe Enzymaktivität nicht durch zelluläre DNA-Polymerase vorgetäuscht wird, was anzunehmen ist (siehe Diskussion), müssen sich in den Zellen viele virale Partikel befinden, die diese hohe Reverse-Transkriptase bewirken.

Tab. 11a: Reverstasaktivität im Leukozytensediment (mikrosomale Fraktion der Zellen) nach Kurzzeitkultivierung bei 5 Kontrollprobanden, 3 T-Zell-Lymphom- (M.f.) und 3 T-Zell-ALL-Patienten



3.5. Dichtegradientenzentrifugation von Zellpellet

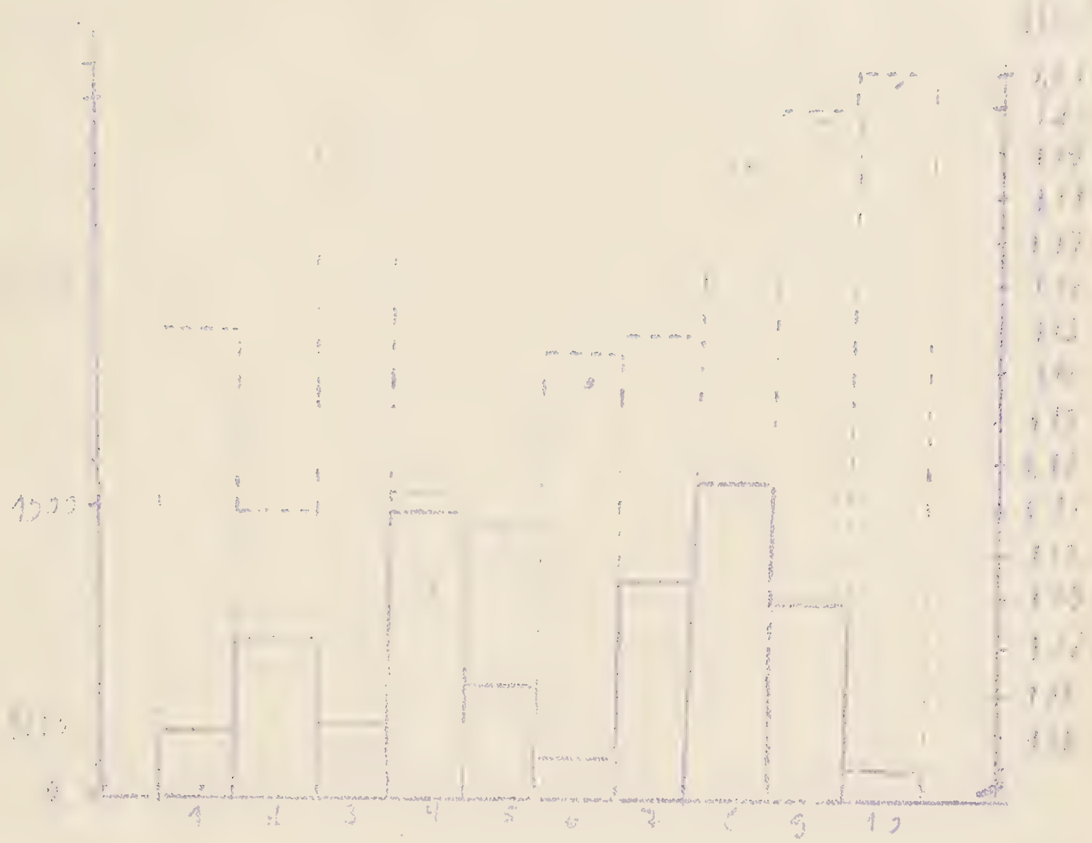
3.5.1. Bei Kontrollprobanden ohne/nach Kurzzeitkultivierung

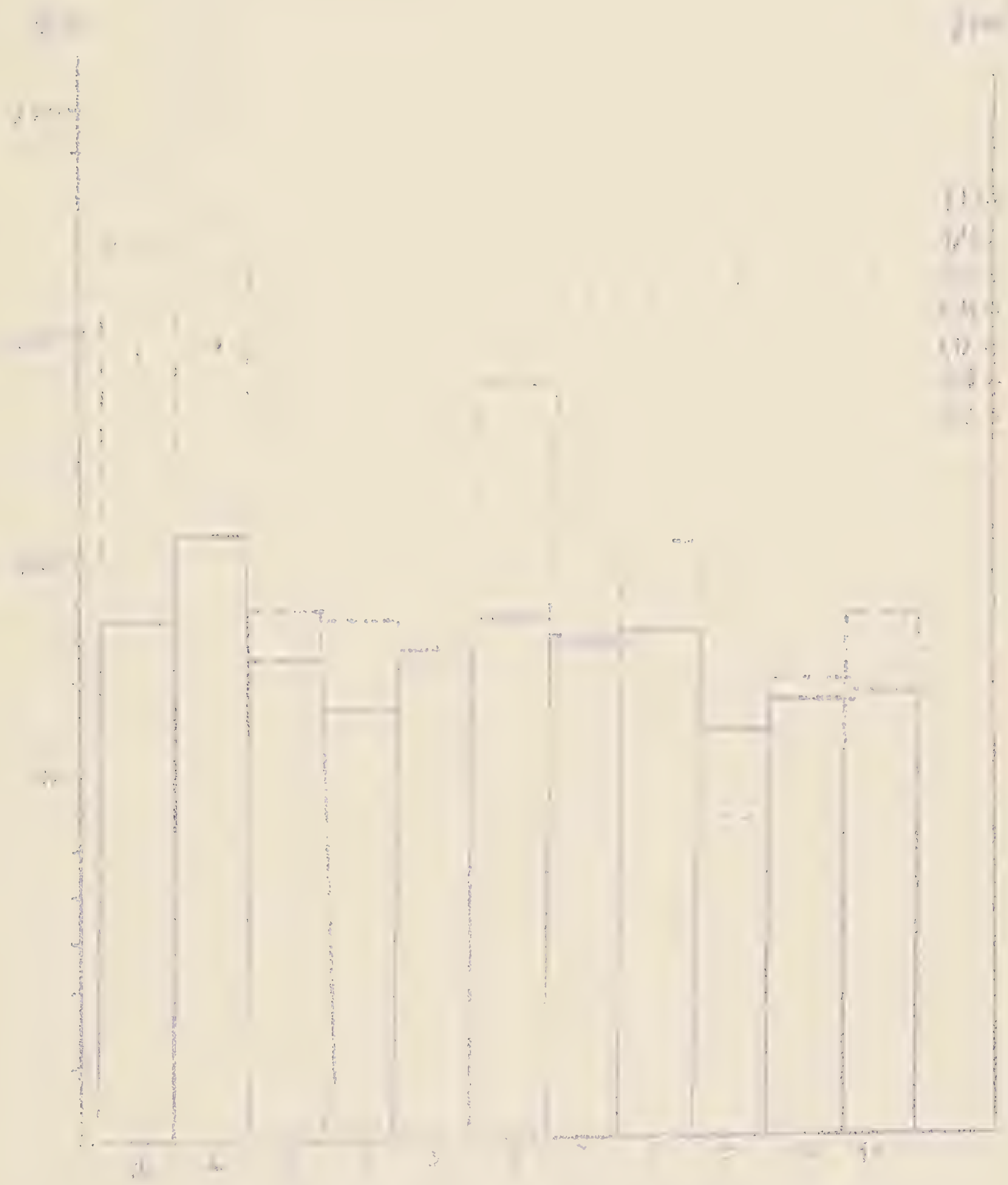
Zellpellets zweier Kontrollprobanden (W.B. und G.), W. hatte 1980 ebenfalls erhöhten poly rA-abhängigen Einbau, (2,35 pmol/10^8 Zellen) gezeigt, wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, um virale Partikel anzureichern; Probandin B. und G. zeigten keinen Anstieg der RT-Aktivität im für Retroviren charakteristischen Bereich (Abb. 3 und 4), dagegen zeigte W. einen

Gipfel im Bereich von 1,12 - 1,13 g/cm³, einer im verschobenen Bereich. Nach Definition waren bei W. wiederholt in einem Zeitraum Partikel im Dichtebereich von Retroviren und Reverse-Transkriptaseaktivität isoliert worden. Zur biologischen Bewertung [illegible] werden, deshalb wurde für Saccharose-Gradienten nach Konzentrierung wiederholt. Es traten wieder zwei Gipfel in der Fraktion der 1,16 g/cm³ und 1,18 g/cm³ auf.

Nach zwei Jahren wurde der Dichtegradient ein weiteres Mal durchgeführt. Über den Fraktionen mit den Dichten 1,16, 1,18 und 1,20 - 1,21 g/cm³ wurden erhöhte ³H-TdR-Einbauraten gefunden.

Wir kommen zu dem Schluß, daß bei Probanden W. ein unbekanntes Virus mit gesteigertem ³H-TdR Einbau in Dichtefraktionen vorliegt, die für Viruspartikel charakteristisch sind.


1000
500
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10



Abszisse: Fraktionen 1 bis 11 des Gradienten von je 1-2 ml

[illegible]

Dichte der jeweiligen Fraktion in g/cm³

[illegible]

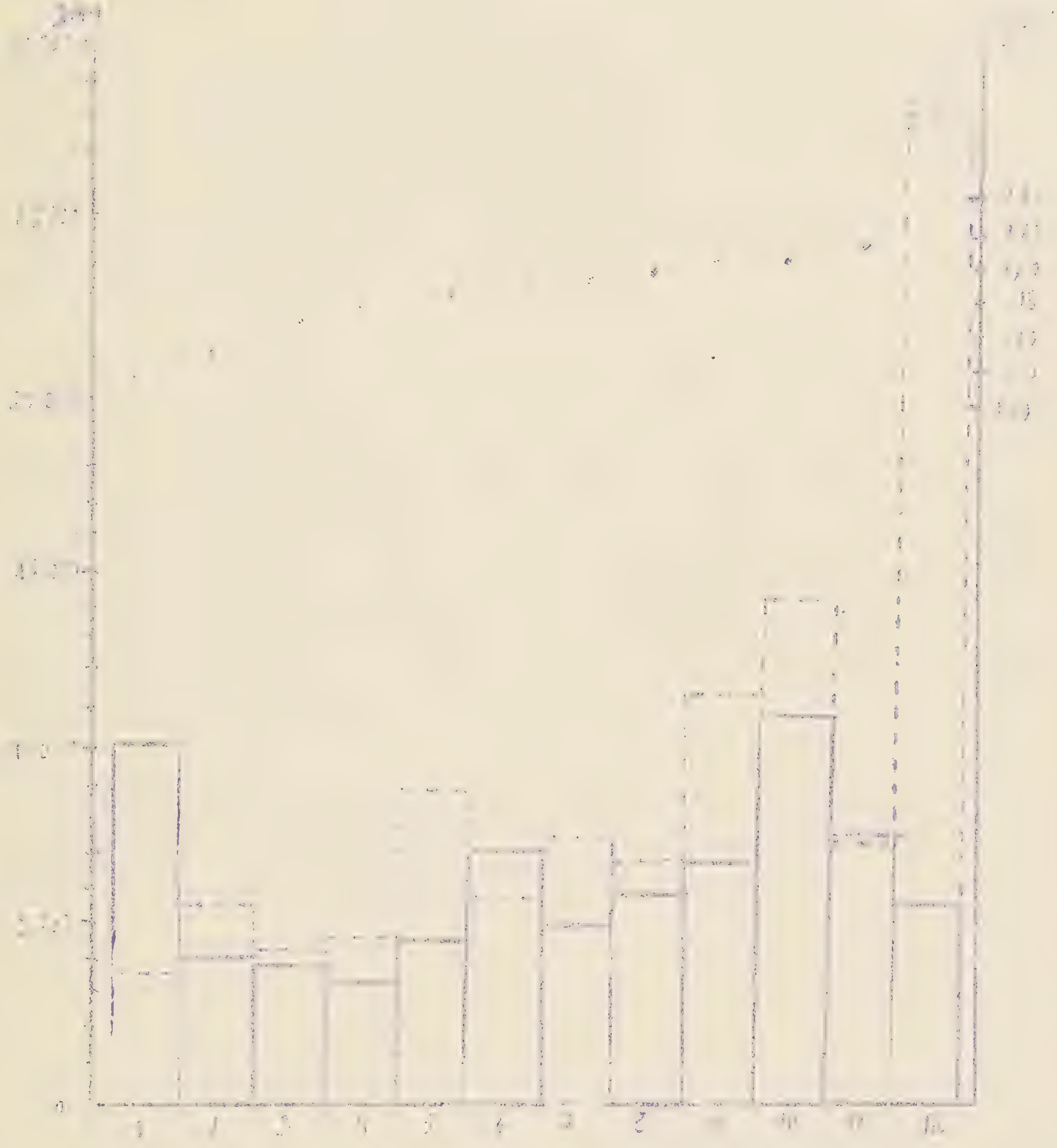


Abb. [illegible]: Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten von je [illegible]

Ordinate: rechts: Dichte der jeweiligen Fraktionen in g/cm³
links: Impulse in DPM aus ³H TTP im säureunlöslichen Niederschlag

— Invertase-Aktivität
··· Polymerase-Aktivität

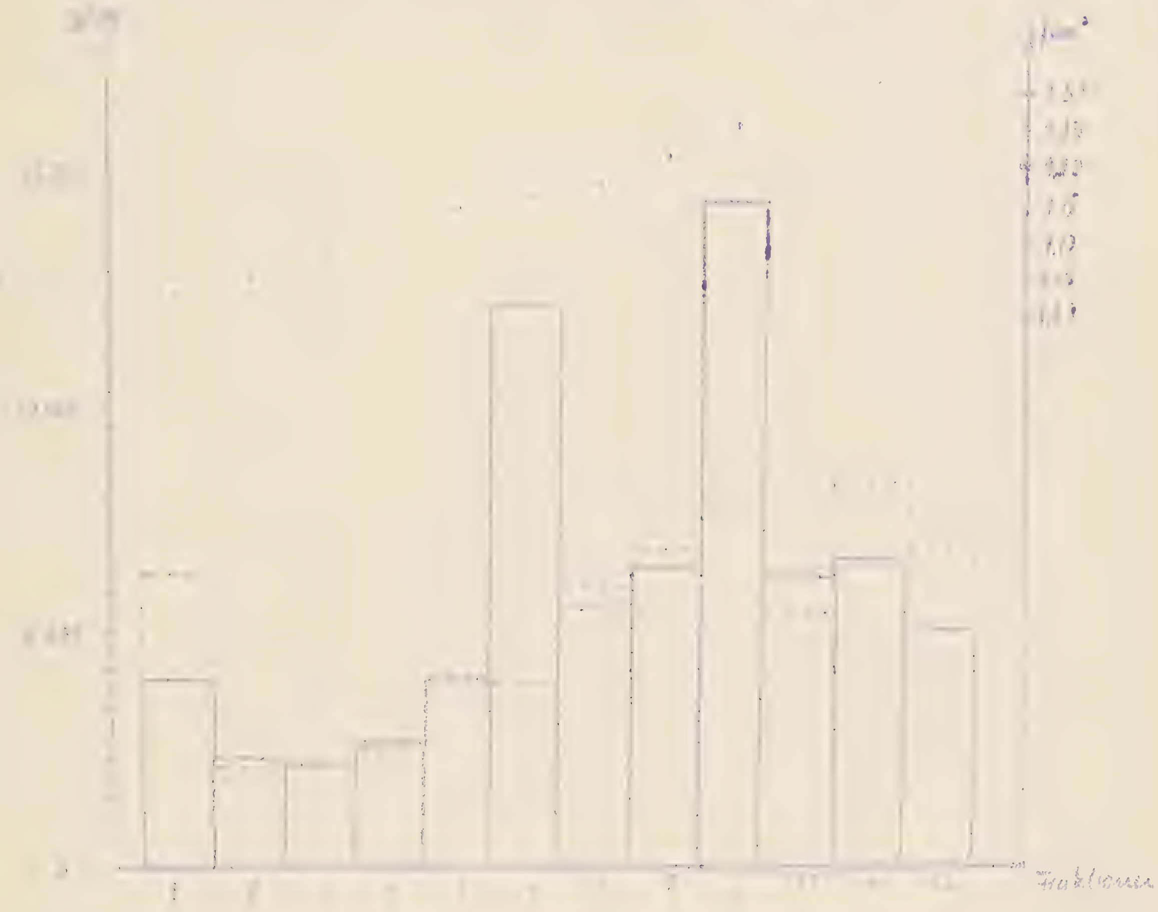
3.5.2. Bei hyperzellulären ALL vom T-Zelltyp ohne Kurzzeitkultivierung

Aufgrund der bei allen Proben bereits ohne Kurzzeitkultivierung aufgetretenen hohen Reverstranskriptaseaktivität schien es uns als notwendig, eine isopyknische Dichtegradientenzentrifugation im linearen 20-60 %-Saccharose-TNE-Gradienten durchzuführen. Typ C-Viruspartikel sedimentieren im Dichtebereich von 1,15 - 1,20 g/cm³.

Vom Patienten H.S. wurden 2,5·10⁸ Zellen eingesetzt. Es stellten sich mehrere poly rA-abhängige Peaks dar (Abb. 9). Es wurde kein Gipfel im charakteristischen Dichtebereich gefunden. Die Reverstranskriptaseaktivität war über einen breiten Dichtebereich von 1,05 bis 1,18 verteilt. Daraus möchten wir schlußfolgern, daß, wenn Viruspartikel vorliegen, diese nicht ihre native Struktur aufweisen, da eingefrorenes Zell-Material verwendet wurde, ist eine Viruspartikelschädigung möglich.

Vom Patienten G.R. wurden 3,3·10⁸ Zellen eingesetzt. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der R-Aktivität bei 1,16 g/cm³ und im Bereich von 1,20 g/cm³.

Abbildung: Dichtegradientenzentrifugation im 20–60 % linearen Saccharose-TNE-Gradienten von Leukozyten des Patienten G.H. ohne Kultivierung. Reverstase- und DNA-Polymerase-Aktivität von 12 Fraktionen im [illegible] der Dichte 1,04 bis 1,38 g/cm³



Bei Patient G.H. ist ein ³H-TTP-Einbau in der Dichtefraktion von 1,16 – 1,20 g/cm³ nachweisbar. Wegen der begrenzten Menge an biologischem Material konnte [illegible] nicht geschnitten und die aktive [illegible] rezentrifugiert werden. [illegible] und eindeutig im [illegible] dargestellt und [illegible]

3.5.3. Bei hyperzellulären T-Zell-ALL nach Kurzzeitkultivierung

Um eine Virusbildung und -freisetzung, falls die Zellen virusinfiziert sind, zu erreichen, wurden die Zellen von beiden Patienten mit einer ALL kultiviert und anschließend die Zelllysate einem Saccharose-Dichtegradienten unterzogen.

Nach viertägiger Kultivierung der Zellen des Patienten H.H. ($270 \cdot 10^6$ Zellen) stellten sich mehrere Maxima der Reverse-Transkriptase-Aktivität dar, unter anderem auch bei 1,14 - 1,16 g/cm^3 (Abb. 8). Dieser Gradient wurde mit einer geringeren Zellzahl wiederholt ($1,44 \cdot 10^6$ Zellen). Hier zeigte sich ein deutlicher und auch vom B-Peak zu unterscheidender R-Peak bei 1,13 - 1,16 g/cm^3.

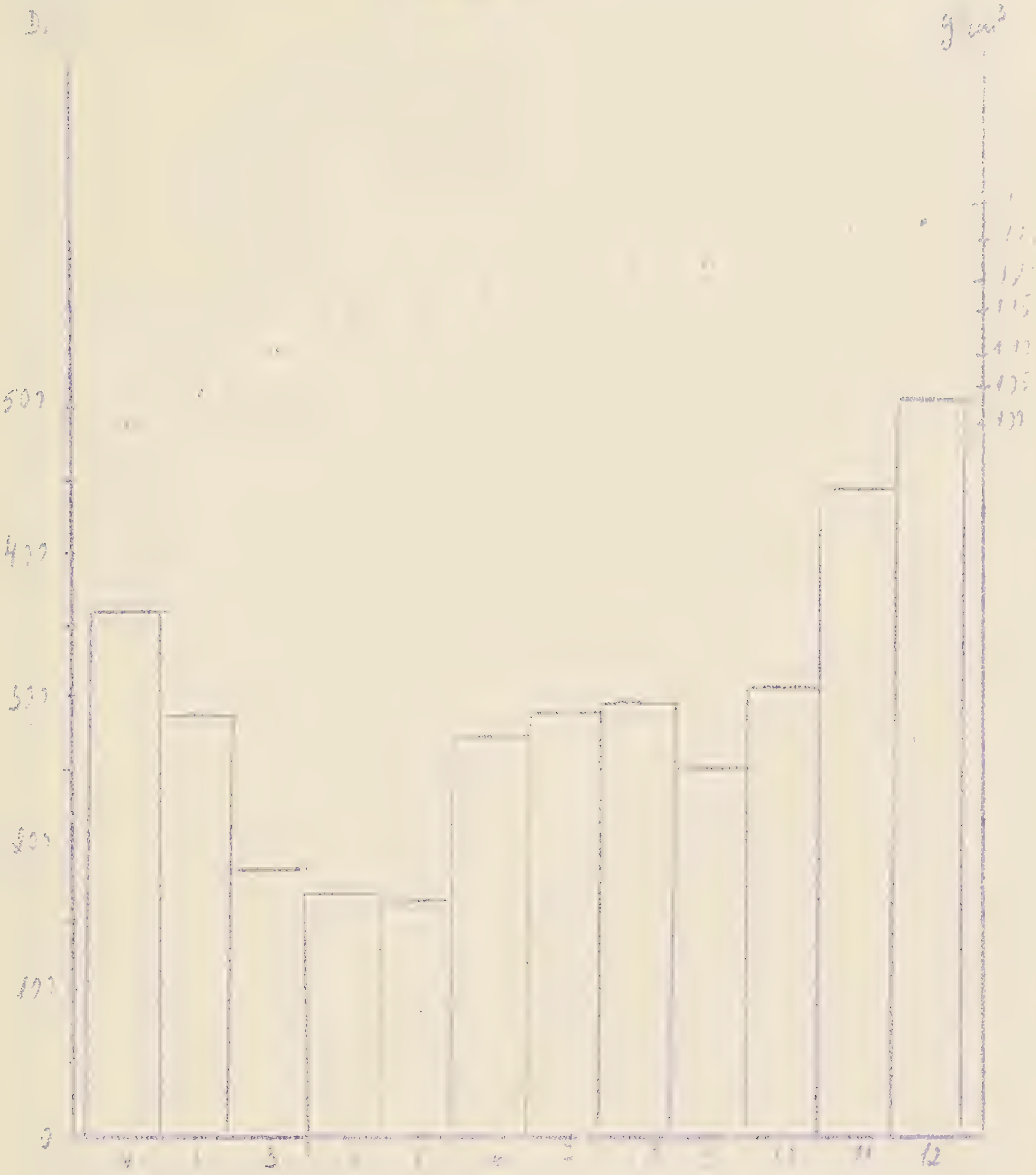
Abbildung: Dichtegradientenzentrifugation im 5-60 % Saccharose-TNE-Gradienten von Lymphozyten des Patienten H.H. nach 3 d Kultivierung ($1,44 \cdot 10^9$ Zellen). Reverstrans- und β-Glucuronidase-Bestimmung in 12 Fraktionen im ZKO der Dichte von 1,03 bis 1,27 g/cm^3.

Das Zellkultursediment (Überstand war leider verunglückt) vom Patienten C.H. mit einer Zellzahl von $2,2 \cdot 10^8$ Zellen wurde ebenfalls einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Es zeigten sich zwei breite Maxima der Aktivität einmal bei 1,17 – 1,18 g/cm³ und noch prominenter bei 1,25 – 1,28 g/cm³ (Abb. 7).

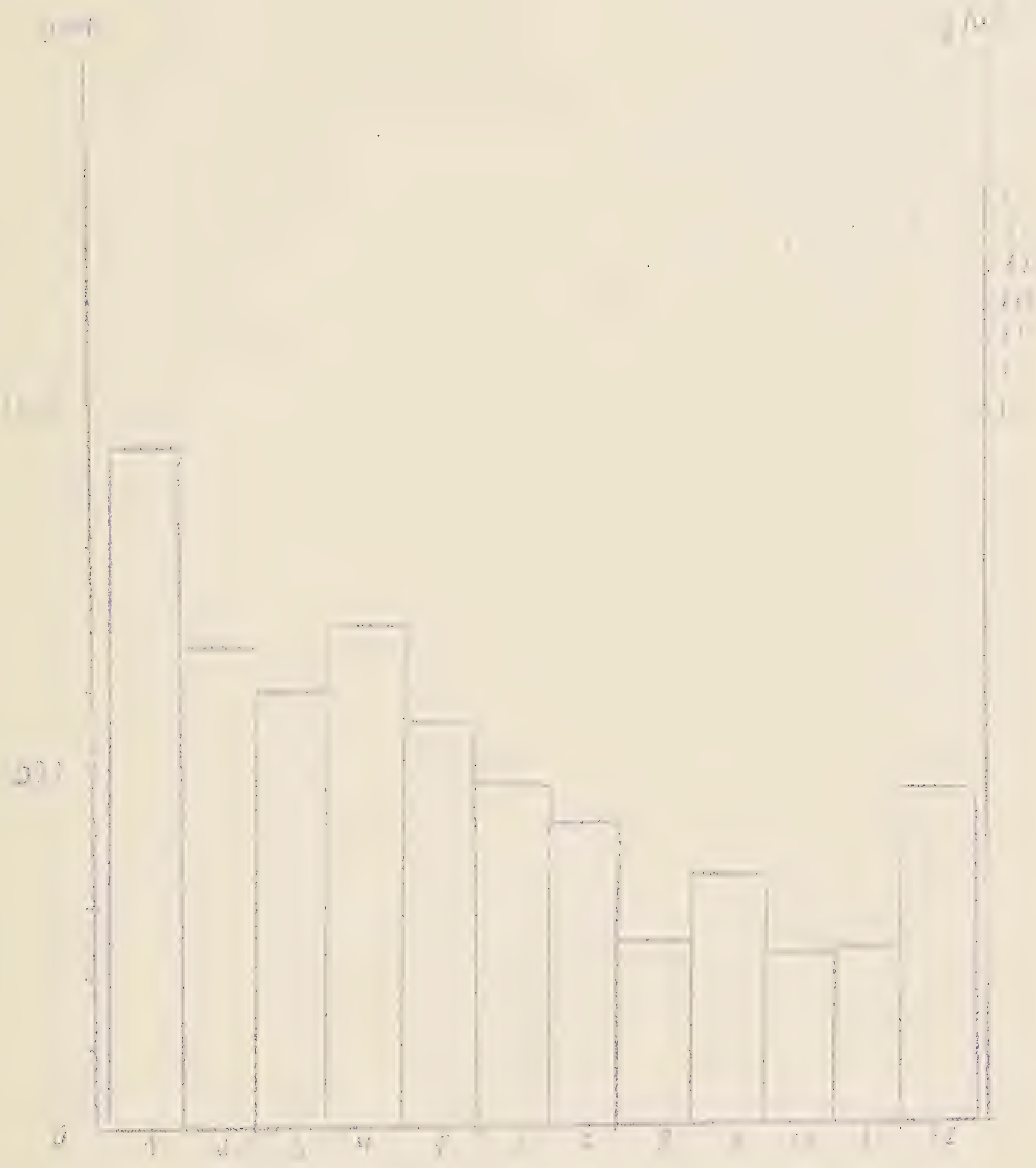
3.6. ^{3}H-Uridin-Einbau und Dichtegradientenzentrifugation

Um eine RNA-Synthese in den Lymphozytenextrakten nachzuweisen und die RNA radioaktiv zu markieren, wurden die Zellextrakte vom Patienten H.K. und von der Kontrollprobandin G. einer Kurzzeitkultivierung unterzogen. Nach 24 h Kultur wäre ein deutlicher RNA-Anstieg zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die RNA mit ^{3}H-Uridin für weitere 24 h inkubiert, um eine Markierung zu erzielen. Im 20-60 % Saccharose-TNE-Gradienten sedimentieren die Virionen und andere Partikel, z.B. Mitochondrien, Plasmamembran, Lysosomen, endoplasmatisches Retikulum, an für sie charakteristischen Dichtebereichen. Hier wurde aufgrund der geringen Ausgangszellzahl auf die Gesamtaktivitätsbestimmung verzichtet.

Bei der Kontrollprobandin ($1,6 \cdot 10^8$ Zellen) zeigten sich von der mikrosomalen Fraktion erhöhte Mengen radioaktiver Substanz in den Dichtebereichen 1,01, 1,21 und 1,28 g/cm³. Im 100000 g Sediment sind die Erhöhungen schärfer dargestellt – bei 1,07, 1,12 und 1,27 g/cm³. Im Dichtebereich von 1,12 – 1,15 g/cm³ war die gemessene Radioaktivität deutlich geringer.

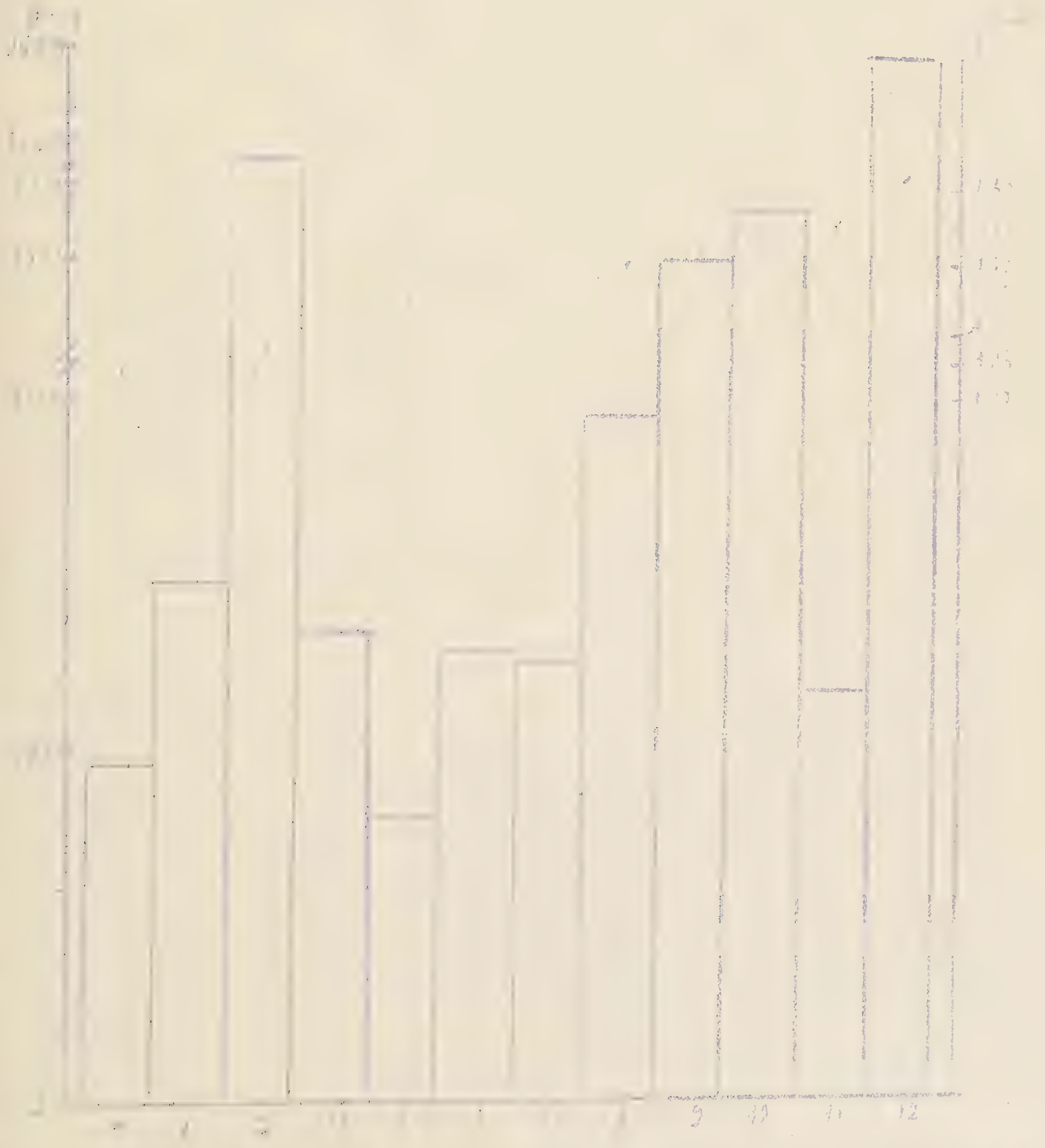


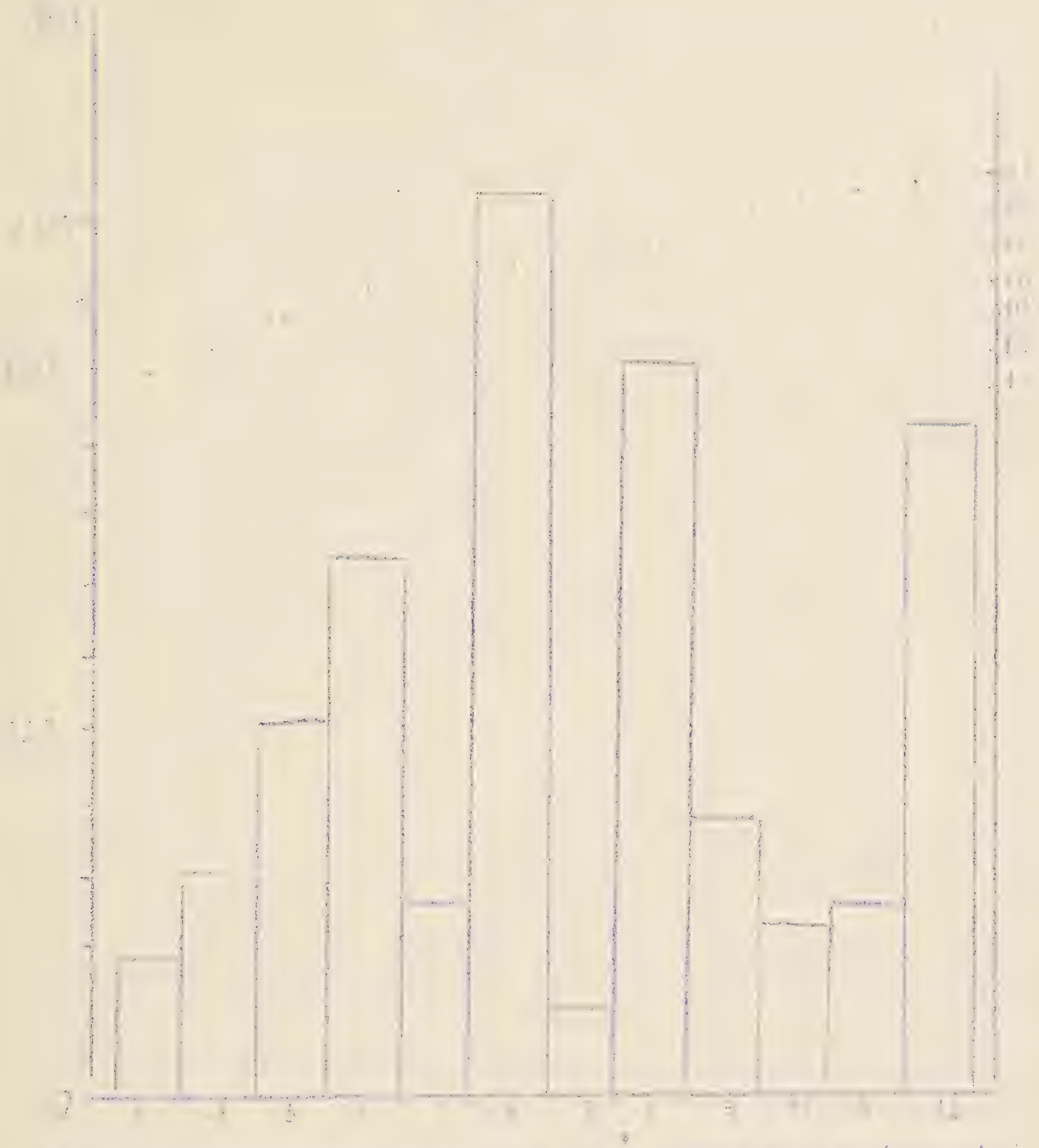
11. Uridin-Einbau und Dichtegradientenzentrifugation bei der Probandin G. im 100 000g Sediment des Zellkulturüberstandes



0
1
12

Von dem 100 000 g Sediment des ZKO nach ³H-Uridin-Einbau beim Patienten H.H. ($4,2 \cdot 10^{9}$ Zellen eingesetzt) stellten sich folgende scharfe Banden dar: bei 1,08, 1,10 – 1,12, 1,20 und 1,21 g/cm³. In der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen wurde nur der Dichtebereich bei 1,18 g/cm³ deutlich hervorgehoben. Dagegen wurden in den Dichtebereichen von 1,10, 1,20 und 1,22 g/cm³ nur halb so hohe Einbauraten festgestellt.





Gradientenlinien und Dichtegradientenverteilung beim Patienten M.K. in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen

Es wäre möglich, daß in dem 100 000 g Sediment von ZMP Ribosomen [illegible] schwere Partikel vorliegen, die in höheren Dichtebereichen sedimentieren (1.15 – 1.22). Der Anstieg in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen ist im Vergleich zur Kontrollprobanden deutlich erhöht. Wahrscheinlich wurde unter diesen Kultivierungsbedingungen keine Vorgewebebildung erreicht oder die Partikel sind inkomplett. Darum könnte sich erklären, warum gerade in

erscheint eine erhöhte Aktivität im verdächtigen Bereich anzunehmen ist.

3.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Um Hinweise für die Natur der Partikel zu erhalten, die bei der Dichtegradientenzentrifugation in dem charakteristischen Dichtebereich zu einer erhöhten Reverstase-Aktivität geführt hatten, wurden parallel zu unseren biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen, in der elektronenmikroskopischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Charité Aufnahmen der Zellen von den Patienten mit einer ALL erstellt. Die Ergebnisse sind bereits von SCHÖNTUBE et al. 1983 publiziert worden (60).

4. Diskussion

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, angeregt von den neuesten internationalen Hinweisen für die Existenz eines T-Zell-spezifischen Retrovirus (HTLV), zu prüfen, ob die Reverstaseaktivität in peripheren Lymphozyten bei humanen T-Zell-Lymphomen und hyperzellulären ALL vom T-Zelltyp nachgewiesen werden kann. Eine andere Frage war, welchen Einfluß die Kurzzeitkultivierung der Zellen auf die hypothetische "Virusproduktion" und die "Virusfreisetzung" ausübt. Es war zu prüfen, ob durch die Dichtegradientenzentrifugation, den ^{3}H-Einbau und die Elektronenmikroskopie die Existenz eines Virus als wahrscheinlich anzunehmen ist.

4.1. Ist die R-Aktivität Reverstase-spezifisch?

In einer ersten Serie sollten Lysate peripherer Lymphozyten von Patienten mit verschiedenen Leukämieformen auf Reverstaseaktivität geprüft werden. Die Werte einer Kontrollgruppe von gesunden Probanden dienten zur Bestimmung des sogenannten Normbereichs. Bei dieser Serie kam ein Reverstasetest zur Anwendung, der zunächst nur [illegible] den In-

zyms des bovinen Leukosevirus ausgearbeitet worden war (22). Eine Besonderheit dieses Testes war die Inkubationstemperatur von 23 °C, die sich beim BLV-Enzym als optimal bei der Verwendung von poly rA als Matrize und oligo dT als Primer herausgestellt hatte. Diese Temperaturbedingungen haben wir auch für die Human-Zellen als günstig befunden (22). Im Vergleich zum BLV-Assay haben wir einige Parameter des ursprünglichen Inkubationsansatzes verändert. Diese betrafen den Zusatz von Mg^{2+} und Mn^{2+} und die Kationenkonzentration. Inzwischen sind in Studien von GALLO et al. für die HTLV-Bestimmung der Reverse Transkriptase ebenfalls optimiert worden (23, 24, 25).

Für die zweite Serie von Versuchen haben wir jedoch die Bedingungen für den Reverse-Transkriptase-Nachweis aus Vergleichsgründen nicht verändert.

Hervorzuheben ist, daß das HTLV-Enzym, wie das BLV-Enzym, Mg^{2+}-abhängig ist und es mit dem zweiten synthetischen Matrizen/Primer-Paar poly rC/oligo dG, als auch mit poly rA/oligo dT, hohe Einbauten erreicht. Uns stand nur poly rA/oligo dT zur Verfügung. In der Tabelle 8 sind die verschiedenen Inkubationsansätze zum Nachweis der Revertasen von BLV und HTLV, sowie der von uns angewandte Ansatz angegeben.

Entsprechende Studien an BLV und später auch an HTLV haben gezeigt, daß virusinfizierte periphere Leukozyten ohne Kultivierung in den meisten Fällen soviel Virus freisetzen, daß der Revertasenachweis gelingt.
Daher wurden in der zweiten Serie von Versuchen Lysate sowohl von nichtkultivierten als auch von kurzzeitig kultivierten Zellen hergestellt. Als Kultivierungsmedium wurde homologes Human-Nabelschnurserum eingesetzt. Aus Transfusionsstudien ist bekannt, daß das HTLV peripher übertragbar ist (21).

Wir setzten homologes zellfreies Nabelschnurserum ein, weil sich Blutzellen des peripheren Blutes in diesem Medium

kultivieren lassen. Transmissionsstudien wurden nicht durchgeführt.

Die zweite Serie stammt von drei adulten Patienten mit Mycosis fungoides und drei Kindern mit einer akuten lymphatischen Leukämie. Für zwei der Leukämiepatienten (O.M. und H.R.) konnte immunologisch ein T-Zelltyp nachgewiesen werden.

Von 30 gemessenen Proben später Mycosis fungoides Patienten sind 23 hinsichtlich der RT-Aktivität signifikant erhöht. Ein Wert liegt im Grenzbereich und nur 6 Werte (= 20 %) befinden sich im "Normbereich".

Bei den T-Zell-ALL lagen insgesamt 12 Proben vor. Von diesen sind nur 3 (= 25 %) im Normbereich, die übrigen 9 Werte sind hingegen signifikant erhöht. Um die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung durch zelluläre DNA-Polymerasen und terminale Transferase auszuschließen, wurden in parallelen Proben Einzelbestimmungen durchgeführt.

Das Vorhandensein einer Transferase-Aktivität durch die DNA-Polymerase (wie in der Einleitung schon erwähnt), wird durch den parallelen Einsatz der synthetischen Matrize/Primer poly dA/oligo dT und einer Inkubationstemperatur von 25 °C verringert.

Im allgemeinen steigen oder fallen die poly dA-abhängigen Einbauten parallel zu den poly rA-abhängigen Einbauten direkt proportional zur gezählten Zellmenge. Eindeutig höhere ^{3}H-TTP-Einbauten bei Zusatz von poly rA als poly dA wurden bei den Mycosis fungoides Patienten ohne Kurzzeitkultivierung festgestellt. Die ^{3}H-TTP-Einbauten ohne Matrize sind zwar auch höher als bei den Kontrollpersonen, jedoch nur halb so hoch wie die Reverse-Transkriptase-Aktivität.

Auch bei den hyperzellulären T-Zell-ALL zeigt die Matrize poly rA höhere ^{3}H-TTP-Einbauten ohne Kultivierung der Zellen.

eine Verunreinigung durch terminale Transferase-Aktivität ist, mit Ausnahme von zwei (n = 33) Proben, nahezu ausgeschlossen.

4.2. Einfluß der Kurzzeitkultivierung auf die Virusproduktion

Wir konnten keine Steigerung der [illegible], mit Ausnahme von einer Probe, nach Kurzzeitkultivierung ermitteln. Im Gegenteil, Reverse-Transkriptase- und DNA-Polymerase-Aktivität fielen nach einem Tag Kultivierung stark ab. In keinem Fall war dies auf eine Abnahme der Zellzahl während der Kurzzeitkultivierung zurückzuführen.

Zu diesem Zeitpunkt wurde noch kein Mediumwechsel vorgenommen, sondern nur ein Aliquot des Mediums aus den Kulturflaschen für den dritten und sechsten Tag der Bestimmung entnommen. Nach drei Tagen fiel die Revertase- und DNA-Polymerase-Aktivität bei den Patienten mit Mycosis fungoides ab, während sie bei den T-Zell-ALL anstieg.

Durch den Mediumwechsel während der Kurzzeitkultivierung könnten die Meßwerte des zweiten bzw. dritten Tages und des sechsten bzw. siebenten Tages negativ beeinflußt sein, da das gewechselte Medium nicht auf Virus geprüft worden ist.

Die Kultivierungsbedingungen sind jedoch noch wahrscheinlich für unsere Fragestellung nicht optimal gewählt. Durch den Einsatz von Nabelschnurserum allein werden die Zellen nicht zur Virusproduktion angeregt.

In der Zukunft sollte geprüft werden, ob durch den kurzzeitigen Einsatz von 5'-Jodo-2'-Desoxyuridin (50 µg/ml) (43) bzw. des T-Zell-Mitogens Phythämagglutinin (PHA) die T-Zellen zur Virusproduktion [illegible]. Möglicherweise verhalten sich unter den Kulturbedingungen die Zellen von Patienten der beiden Erkrankungsgruppen unterschiedlich. Während die Zellen bei Mycosis fungoides Patienten "ruhen" bzw. ihre Virusproduktion einstellen,

sern zu prüfen, ob bei der Zellkulturisolierung eine Selektion virusproduzierender Zellen erfolgt. Zur besseren [illegible] der Zellen gemacht werden. Hierzu ist offenbar ein spezifischer T-Zell-Wachstumsfaktor (GALLO et al. 1976, RUSCETTI et al. 1977) notwendig. Durch Kokultivierung [illegible] Lymphozyten von [illegible] gezüchteten Gewebe ($1 \cdot 10^6$/ml) ist eine Transmission des Virus nachweisbar (22). Der Einsatz von B- und T-Zell-Mitogenen, Concanavalin A und Phytohämagglutinin, bleibt nach wie vor eine der Möglichkeiten, raschere und größere Virusproduktionen zu erreichen ([illegible]). Wir konnten unter unseren Kultivierungsbedingungen zeigen, daß die Kokultivierung mit Nabelschnurzellen allein keine bessere Virusproduktivität erbringt.

6.3. Auswirkungen der Verteilung von der [illegible] [illegible]

Über die Lokalisation der zellulären DNA-Polymerase ist bekannt, daß ein Typ als sogenannte "Assoziation" im Zytoplasma, der andere im Kern und der dritte in den Mitochondrien zu finden sei. Durch die Lyse der Zellen werden auch Kerne und Mitochondrien in unterschiedlichem Ausmaß geschädigt und können ihre Polymerase freisetzen. Nach Abzentrifugation der Kerne und der Mitochondrien werden im Überstand das [illegible] und die durch [illegible] Folglich entspricht die gemessene Aktivität nur einem Teil der Gesamtaktivität der DNA-Polymerasen. Wir haben nicht geprüft, wie sich unterschiedliche Lyseverfahren auf die Verteilung der DNA-Polymerase auswirken.

Der DNA-Polymerase ([illegible]) wird die [illegible] bei der [illegible], wenn sich die [illegible] der Lysepuffer in der [illegible] ändert, so steigt damit ihre Aktivität auf [illegible] [illegible]

Ein weiterer Marker für die Syntheseaktivität und damit der Unreife der Zellen ist der von KIDRIC et al. 1970 beschriebene "^{3}H-Thymidin-Labelling-Index" von Knochenmarkszellen zur Kontrolle von einem Therapieerfolg bzw. Krankheitsverlauf bei akuten Leukosen, der Auskunft darüber gibt, ob sich der Patient noch in der Remission befindet oder ob ein Rezidiv zu erwarten ist (38).

Wir stellten uns die Frage, ob das Verhältnis von der R- zu der D-Aktivität für eine Auswertung unserer Ergebnisse herangezogen werden kann. Bei hohen poly dA- und niedrigen poly rA-abhängigen Einbauten, ist an eine Verunreinigung mit DNA-Polymerasen und an die Unreife der Zellen zu denken.

Bei den Mycosis fungoides Patienten fanden wir ein Verhältnis (ohne Kultivierung) von 1:0,8 und 1:1,1. Mit der Kultivierung verschiebt sich der Quotient zugunsten der DNA-Polymerasen, obwohl auch eine Zellvermehrung zu beobachten ist. Hier ist vor allem an die Unreife der vermehrt gebildeten Zellen zu denken.

Bei den T-Zell-ALL-Patienten fanden wir ohne Kultivierung Verhältnisse von 1:1,0 und 1:1,75 vor. Nach einem Tag Kultivierung steigt die Zellzahl auf das Doppelte (in einem Fall bis auf das Fünffache) an, damit ändert sich auch das R:D-Verhältnis zugunsten der DNA-Polymerasen, vor allem im Zellkulturüberstand (100000 g Anteil des Kulturüberstandes). Nach weiterer Kultivierungsdauer sinkt die Zellzahl. Das Verhältnis poly rA-/ poly dA-abhängiger Einbauten verschiebt sich jetzt zugunsten der Reversase. Möglicherweise erreichen die Zellen am dritten Tag, nachdem nach dem ersten Tag das Medium gewechselt wurde, den [illegible] wie die Zellen ohne Kultivierung.

Der Quotient R-:D-Einbauten in menschlichen Leukozyten- und Zellkulturlysaten gibt uns dennoch eine Orientierung zur Einstufung, jedoch sind die Absolutwerte der Enzymaktivitäten selbst aussagekräftig.

4.4. Dichtegradientenzentrifugation

In den Gradientenbildern von den Patienten ohne und nach Kurzzeitkultivierung der Zellen traten nicht nur erhöhte RT-Aktivitäten im für Retroviren charakteristischen Bereich von 1,15 - 1,18 g/cm³, sondern auch im Bereich von 1,03 - 1,07 und 1,25 - 1,30 g/cm³ auf. Das gleiche Verhalten kommt bei den ³H-Uridin-Gradienten und bei normalen Probanden (ausgenommen die Retrovirus-Dichte) vor. Die erhöhten RT-Aktivitäten im Bereich niederer Dichte (1,03 - 1,07 g/cm³) beruhen wahrscheinlich auf zellulärer Reverseaseaktivität.

In den dichteren Bereichen von 1,25 - 1,30 werden Core-Partikel und anderseitig an Zellkulturen gebundene Enzymaktivitäten vermutet.

Elektronenoptische Aufnahmen unterstützen die Vermutung, daß die Partikel auch membranständig sein sollen (80). Für die Typ C-Viren sind intrazelluläre Viruspartikel bisher nicht beschrieben worden. Die Ergebnisse von dem Reversetasetest und der Dichtegradientenzentrifugation sind allein auch ohne Kultivierung aussagekräftig.

Da die Reversease-Aktivität und der charakteristische Dichtebereich im Saccharose-Gradienten im Zellkultursediment nach längerer Kultivierung erhöht ist, der Anstieg deutlicher wird, könnte geschlußfolgert werden, daß die Zellen zwar das Virus produzieren, dieses aber nicht freisetzen.

4.5. Sind die vorliegenden Ergebnisse für das Auftreten von Retroviren in Human-Geweben verdächtig?

Die Beweise für das Vorhandensein einer HTLV-Infektion wurde bereits in der Einleitung ausführlich erörtert. Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Reversetaseaktivität an Proben von kutanen T-Zell-Lymphomen sprechen dafür, daß Retrovirus-Partikel vorliegen könnten. Eine Dichtegradientenzentrifugation konnte aufgrund der limitierten Blutproben nicht durchgeführt werden.

Bei den T-Zell-ALL-Fällen haben wir sichere Hinweise auf das Vorhandensein eines Virus (00). Ob dieses Virus zur HTLV-Gruppe gehört, bleibt noch fraglich. Das Wachstum, der Wachstumsverlauf und die elektronenoptischen Aufnahmen sprechen für ein Virus, jedoch fehlen noch immunologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Verifizierung und Identifikation des Virus. Ein Infektionsmodus muß noch an einem geeigneten Tiermodell nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse liefern Hinweise auf die Existenz von Typ C-Retrovirus-Partikeln bei Mycosis fungoides und T-Zell-ALL. Der Beweis für HTLV muß noch erbracht werden.

Von großer Wichtigkeit wäre die Etablierung einer virusproduzierenden Zellinie, die es gestattet, reproduzierbar ausreichendes Virusmaterial für die Viruscharakterisierung zu gewinnen.

Mittels Vergleichsseren könnte geprüft werden, ob eine immunologische Verwandtschaft zwischen diesen Virus-Partikeln und dem HTLV besteht. Transmissionsstudien in vitro und in vivo könnten über den Virusursprung Aufschluß geben.

[illegible]. Literatur

1. ARYA S.K., L. JOB, R. CHAWDA
   Oncology, 37, 129-135, 1980
2. BALTIMORE D. Nature, 226, 1209-1211, 1970
3. BARBACID M., [illegible], [illegible]
   Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.77, Nr.3, 1617-1621, 1980
4. BARRE-SINOUSSI F., J.C. CHERMANN, F. REY, M.T. NUGEYRE, S.CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VEZINET-BRUN, C.ROUZIOUX, W.ROZENBAUM, L.MONTAGNIER
   Science, Vol.220, 20.05.1983
5. BLATTNER W., R.C. GALLO
   Tagungsabstrakt 1981
6. BLATTNER W., V.S. KALYANARAMAN, M.ROBERT-GUROFF, A.LISTER, [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], [illegible], R.C.GALLO Int.J.Cancer, 30,[illegible],1982
7. [illegible] D.H.L., [illegible], [illegible], [illegible]
   J.VIROLOGY 8, 730-741, 1971
8. BOYUM A.
   Scand.J.Clin.Labor.Invest., 97, 1968
9. BRAUN W. Dermatologie, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1977) 2. Auflage
10. CALAFAT J., A.A.[illegible] Virology [illegible](1), 48-53, 1977
11. CHANDRA P. FEBS, Vol.61, Industrial and clinical enzymology
12. CHANDRA P., [illegible], [illegible]
    Cellular and molecular biology, Vol.27 (2/3), 259-261, 1981
13. CHEN I.S.Y., [illegible], [illegible], [illegible], D.W.GOLDE Nature, Vol.305, 05.10.1983
14. DION A.S., [illegible], A.A.[illegible], [illegible]
    Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77([illegible]), [illegible], [illegible] 1980
15. DRESCHER B.
    Dissertation 1977, [illegible]
16. EISENMANN R.N., V.M. VOGT
    Biochim.Biophys. Acta, 473, 187-239, 1978

17. ESSEX M., M.F.McLANE, T.H.LEE, L.FALK, C.W.S.HOWE, J.I.MULLINS, C.CABRADILLA, D.P. FRANCIS
Science Vol. 220, 20.05.1983
18. FARAS A.J., J.E.DAHLBERG, R.C.SAWYER, F.HARADA, J.M.TAYLOR, W.E.LEVINSON, J.M.BISHOP, H.M.GOODMAN
J.Virology 13, 1134-1142, 1974
19. GALLAGHER R.E., H.MONDAL, D.P.MILLER, G.J.TODARO, D.H.GILLESPIE, R.C. GALLO
Modern Trends in Human Leukemia 1, 185-196, 1974
20. GALLO R.C.
Modern Trends in Human Leukemia 1, 227-236, 1974
21. GALLO R.C.
Schweiz.Med.Wochenschrift 107(41), 1438-1440, 1977
22. GALLO R.C., M.POPOVIC, P.SARIN, F.WONG-STAAL, M.S.REITZ Jr.
Tagungsabstrakt 1981
23. GALLO R.C., D. MANN, S.BRODER, F.W.RUSCETTI, M.MAEDA, V.S.KALYANARAMAN, M.ROBERT-GUROFF, M.S.REITZ Jr.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.79, 5680-5683, 1982
24. GALLO R.C., M.S.REITZ Jr.
J.N.Ci., Vol. 220, 20.05.1983
25. GALLO R. C., P.S.SARIN, E.P.GELMANN, M.ROBERT-GUROFF, E.RICHARDSON, V.S.KALYANARAMAN, D.MANN, G.D.SIDHU, R.E.STAHL, S.ZOLLA-PAZNER, J.LEIBOWITCH, M.POPOVIC
Science, Vol. 220, 20.05.1983
26. GAUTSCH J.W., A.F.KNOWLES, F.C.JENSEN, N.O.KAPLAN
Pro.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.77 (4), 2247-2250, 1980
27. GELMANN E.P., M.POPOVIC, D.BLAYNEY, H.MASUR, G.SIDHU, R.E.STAHL, R.C.GALLO
Science, Vol. 220, 20.05.1983
28. GEORGIEVA M.
Diplomarbeit 1980, ZIM, Abt. Zelldifferenzierung
29. GREAVES M., G.JANOSSY
Biochim.Biophys. Acta, 516 (2), 193-230, 1978
30. IUB-7 Studie 1978: "Nutzung der [illegible] für Forschung, Human- und Veterinärmedizin"
ZIM, Abt. Zelldifferenzierung
31. HINUMA Y., K.NAGATA, M. HANAOKA, M.NAKAI, T.MATSUMOTO, K.-I.KINOSHITA, S.SHIRAKAWA, I.MIYOSHI
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.78(10), 6476-6480, 1981

32. HINUMA Y., H.KOMODA, T.CHOSA, T.KONDO, M.KOHAKURA, T.TAKENAKA, M.KIKUCHI, M.ICHIMARU, K.YUNOKI, Y.SATO, R.MATSUO, Y.TAKIUCHI, H.UCHINO, M.HANAOKA
Int.J.Cancer, 29, 631-635, 1982

33. INNES, J., M.KUNTZ, Y.T.KIM, M.WEKSLER
J.Clin.Invest., 64, 1608-1613, 1979

34. JACQUEMIN, P.C.
Cancer Research 42, 3828-3830, 1982

35. KALYANARAMAN V.S., M.G. SARNGADHARAN, B.POIESZ, F.W.RUSCETTI, R.C. GALLO
J.Virology, 38(3), 906-915, 1981

36. KALYANARAMAN V.S., M.G.SARNGADHARAN, P.A.BUNN, J.D.MINNA, R.C. GALLO
Nature, 294 (5838), 271-273, 1981

37. KALYANARAMAN V.S., M.G.SARNGADHARAN, Y.NAKAO, Y.ITO, T.AOKI, R.C. GALLO
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.79: 1653-1657, 1982

38. KALYANARAMAN V.S., M.G.SARNGADHARAN, M.ROBERT-GUROFF, I.MIYOSHI, D.BLAYNEY, D.GOLDE, R.C.GALLO
Science, 218, 05.11.1982

39. [illegible] K., R.[illegible], P.LANGER, [illegible], K.[illegible]
Dtsch.Gesundheitswesen [illegible], [illegible], 1976

40. KLEIHAUER E.
Hämatologie, Springer-Verlag, 1978

41. KORTING G.W.
Dermatologie in Klinik und Praxis für die fachärztliche Weiterbildung in drei Bänden, Georg Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 1980

42. MARX J.L.
Science, Vol.220, 20.05.1983

43. MIYOSHI I., I.KUBONISHI, S.YOSHIMOTO, T.AKAGI, Y.OHTSUKI, Y.SHIRAISHI, K.NAGATA, Y.HINUMA
Nature, Vol. 294, 1981

44. MORGAN D.A., F.W. RUSCETTI, R.C.GALLO
Science, 193, 1007-1008, 1976

45. NODA M., M.KURIHARA, T.TAKANO
Nucleic acid research, 10(8), 1982

46. OROSZLAN S., M.G.SARNGADHARAN, T.COPELAND, V.S. KALYANARAMAN, R.GILDEN, R.C.GALLO
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.79, 1291-1294, 1982

47. POIESZ B.J., F.W. RUSCETTI, A.F.GAZDAR, P.A.BUNN, J.D.MINNA, R.C.GALLO
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.77 (12), 7415-7419, 1980

48. POPOVIC M., P.S.SARIN, M.ROBERT-GUROFF, V.S. KALYANARAMAN, D.MANN, J.MINOWADA, R.C.GALLO
Science, 219, 856-859, 1983

49. POSNER L.E., M.ROBERT-GUROFF, V.S.KALYANARAMAN, H.P.POIESZ, F.W.RUSCETTI, B.FOSSIECK, P.A.BUNN jr., J.D.MINNA, R.C.GALLO
J.Exp.Med., 154, 333-346, 1981

50. PRIMROSE
"Einführung in die Virologie", 1975

51. REITZ M.S. jr., B.J.POIESZ, F.W.RUSCETTI, R.C.GALLO
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.78(3), 1887-1891, 1981

52. REITZ M.S. jr., M.POPOVIC, V.S.KALYANARAMAN, M.ROBERT-GUROFF, M.[illegible], D.MANN, R.C.GALLO
Tagungsabstract 1983

53. REITZ M.S. jr., M.POPOVIC, B.F.HAYNES, S.C.CLARK, R.C.GALLO
Virology 126, 688-692, 1983

54. RHO H.M., B.J.POIESZ, F.W.RUSCETTI, R.C.GALLO
Virology 112, 355-360, 1981

55. ROBERT-GUROFF M., Y.NAKAO, K.NOTAKE, Y.ITO, A.SLISKI, R.C.GALLO
Science, 215, 975-978, 1982

56. [illegible] M.
Dissertation [illegible]

57. SARIN P.S., M.POPOVIC, V.S.KALYANARAMAN, M.ROBERT-GUROFF, M.G.SARNGADHARAN, J.MINOWADA, T.AOKI, D.MANN, W.BLATTNER, S.BRODER, R.C.GALLO
Tagungsabstract 1983

58. [illegible]
Acta Haem[illegible], 6[illegible], [illegible], 1979

59. [illegible]
[illegible], 1980

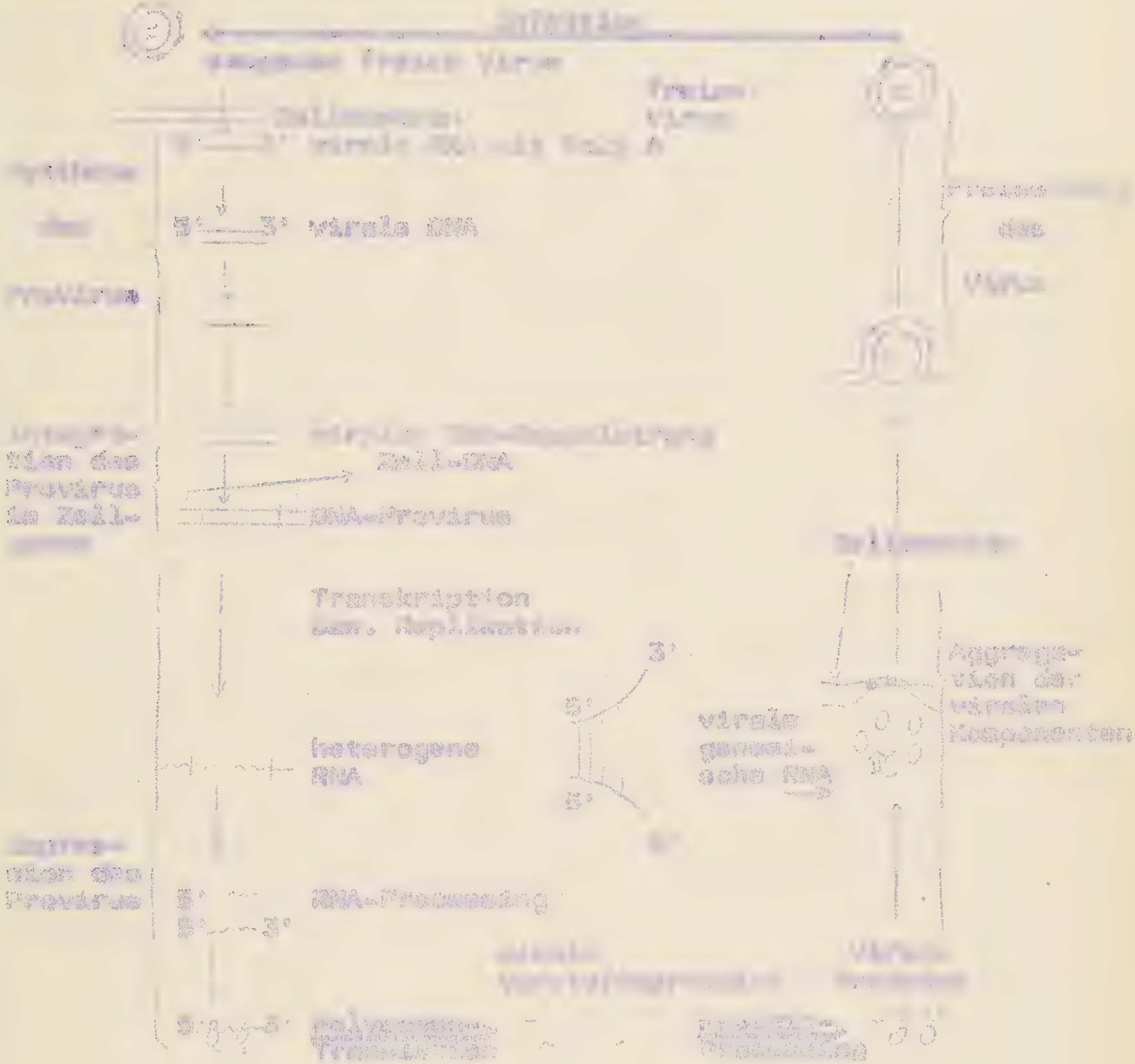
60. [illegible] H., [illegible]
Pädiatrie und Grenzgebiete [illegible], [illegible], 1973
61. [illegible] H., [illegible]
[illegible], [illegible](42), [illegible], 1977
62. SCHULZ F.H., H.STOBBE
Grundlagen und Klinik innerer Erkrankungen Bd.III
3.Auflage, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin [illegible]
63. SNYDER H.W.jr., E.FLEISSNER
Proc.Natl.Acad.Sci., USA, Vol.77(3) [illegible], 1980
64. [illegible]
In: Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten,
Erg.-Werk, Bd.II/2, Hrsg.von J.Jadassohn, Springer-Verlag, Berlin 1965
65. SPIEGELMAN S.
Modern Trends in Human Leukemia II, [illegible], 1976
66. SPIEGELMAN S., A.BURNY, [illegible], [illegible]
Nature 227, [illegible], 1970
67. [illegible], [illegible]
Brit. J.Haematol. 50: [illegible], 1982
68. [illegible] A.
Lehrbuch der Inneren Medizin, VEB Gustav Fischer Verlag
Jena, 1983
69. [illegible]
J.Biol.Chem. [illegible](2), [illegible], 1984
70. TEMIN H.M., S.MIZUTANI
Nature 226, 1211-1213, 1970
71. TODARO, G., R.C.GALLO
Nature 244, [illegible], 1973
72. [illegible]
Modern Trends in Human Leukemia II, [illegible], 1976
73. [illegible]
Acta Morph.Acad.Sci.Hung. [illegible], 1980
74. [illegible]
Science [illegible], 1980
75. VERMA, I.M.
Biochem.J.(?) [illegible], 1981
76. [illegible]
Biochim.Biophys.Acta 473, 1-38, 1977

77. [illegible] H., [illegible]
Med.microb.Immunol. 170, 135-143, 1981
78. [illegible] A., [illegible], A.[illegible], [illegible]
Modern Trends in Human Leukemia I. 175-184, 1974
79. YOSHIDA H., [illegible]
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.79, [illegible], 1982

Nachtrag:
SEIKI M., S.HATTORI, Y.HIRAYAMA, M.YOSHIDA
[illegible] 1983

ANG

Schema 1 Zyklus der RNA-Tumorviren



Die Infektion mit den RNA-Tumorviren beginnt mit dem Anheften und anschließendem Eindringen der Viren in für sie empfängliche Zellen des befallenen Wirtes. Intrazellulär wird das Virusenzym "reverse Transkriptase oder Reverase" aktiviert, welches die doppelsträngige virale DNA aus der

viralen RNA synthetisiert. Die Synthese der viralen Provirus-DNA erfolgt an der viralen RNA,und zwar vom 3' zum 5' Ende der RNA. Sie benötigt für den Start einen Rest mit freier 3'-OH-Gruppe. Unter natürlichen Bedingungen dient eine tRNA als Primer. Die erste DNA-Kopie wird, nachdem die virale RNA durch die RNase H abgebaut worden ist, als Matrize für die Synthese des zweiten DNA-Stranges gebraucht. Die nichtintegrierte infektiöse doppelsträngige virale DNA wird in die DNA der Wirtszelle als Provirus integriert und liefert bei Transkription sowohl die genomische virale RNA für die Viruspartikelbildung, als auch die virale m-RNA für die Synthese hochmolekularer Proteinvorstufenmoleküle und nach deren spezifischer Spaltung die aktiven viralen Proteine der Viruspartikel.

Anschließend erfolgt die Aggregation der viralen Proteine und der viralen genomischen RNA. Damit ist das Virus in der Wirtszelle synthetisiert und diese endgültig transformiert. Die Ausschleusung des Virus wird nach Umhüllung mit einer lipidhaltigen Hülle oder durch Ausstoßen der gestalteten Viren aus der geplatzten Wirtszelle ermöglicht. Das freigesetzte Virus ist wiederum infektionsfähig und kann weitere Zellen infizieren.

[illegible]

Ribosomen

Im "[illegible]" wird die Reparatur durch Synthese von viraler c-DNA an der viralen RNA und gleichzeitig durch virale RNA in [illegible] S-Bereich nachgewiesen. Die Technik erlaubt den Nachweis einer [illegible]-Reaktionsprodukten, das im [illegible] bei 60–70 S [illegible], die Prüfung der [illegible]-Empfindlichkeit des Komplexes und den Nachweis, daß alle 4 Desoxynukleosidtriphosphate für die Reaktion notwendig sind, [illegible] auf [illegible] markiert.

Schema 2 Virusisolierung aus weißen Blutzellen und [illegible] [illegible]

Blut
↓
Ficoll-Hypaque
40 min 1200 U/min

Zellgewinnung

Sediment Grenzschicht Überstand
Erythrozyten Leukozyten
↓
[illegible]-Puffer
↓
Zentrifugation
10 min 1200 U/min

Sediment Überstand
weiße Blutzellen
↓
RSB-Puffer
Frieren/Tauen

Zellyse

↓
[illegible]-Zentrifugation
10 min 12,000 U/min

Sediment Überstand
↓
Saccharose-TNE-Puffer
30 min, 35,000 U/min

Viruspartikelisolierung

Überstand Sediment
↓
Detergent-Medium IV
30 min Lyse

Virus-
lyse

Test

↓
Ansatz I (Mg^{++} Mn^{++})
Ansatz II (Mg^{++})
poly rA/oligo dT bzw.
poly dA/oligo dT
^{3}H-TTP

→ Inkubation 60 min Eisbad

Säurefällung mit
5% TCA, 20 min
↓
Absaugen über
Membranfilter
↓
Scintillations-
Messung in
CPM

Tabelle 3: [illegible] in cpm/10 µl und pro 10^6 [illegible] Zellen

n.b. = nicht bestimmt

(+) = vorhanden, jedoch zu vernachlässigende Aktivität

ZÜ = [illegible]

ZS = [illegible] Fraktion der kultivierten Zellen

Kontroll-personen		Tage Kultur in d	Zellzahl gesamt $\cdot 10^6$	pro 10 µl $\cdot 10^5$	[illegible] in cpm/10 µl ZÜ	ZS	[illegible] ZÜ	ZS	[illegible] in cpm/10 µl ZÜ	ZS
T.	♀	0	5,70	0,26	n.b.	1801	n.b.	7,02	n.b.	105,6
		5	1,12	0,26	0	1882	0	21,46	0	1117,6
2.	♀	0	0,80	0,13	n.b.	61	n.b.	(+)	n.b.	1487,3
		5	1,00	0,09	0	2445	0	[illegible]	0	[illegible]
H.	♀	0	1,73	0,11	n.b.	58	n.b.	(+)	n.b.	1087,3
		3	1,00	0,10	580	875	0,09	5,12	1130,0	1103,0
		7	2,02	0,26	n.b.	7078	n.b.	0,18	n.b.	147,9
G.	♂	0	2,35	0,26	n.b.	0	n.b.	0	n.b.	0
		3	4,47	0,30	0	0	0	0	0	0
		7	2,02	0,11	0	0	0	0	0	0
W.	♂	0	3,86	0,20	n.b.	0	n.b.	0	n.b.	0
		3	0,42	0,06	242	400	0,08	0,04	0	[illegible]
		7	1,38	0,10	2886	0	[illegible]	0	[illegible]	0

Tabelle 3: [illegible]

Diagnose	Pat.	Tage Kultur	Zellzahl gesamt		Aktivität in DPM/10 µl		Aktivität in pmol		Ratio in DPM 10 µl		Bemerkungen
					ZKÜ	ZMS	ZKÜ	ZMS	ZKÜ	ZMS	
		0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	[illegible]	[illegible]
[illegible]	L.R.	1	[illegible]	0,[illegible]	151	121	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
	5	3	[illegible]	0,[illegible]	1010	0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
		14	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	
[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	[illegible]	n.b.	[illegible]	n.b.	[illegible]	n.b.	[illegible]	[illegible]
	[illegible]	1	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
		2	0,21	7,5	(o)	1049	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
		7	[illegible]	[illegible]	720	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
											[illegible]
[illegible]	D.T.	0	0,78	6,5	n.b.	37601	n.b.	22,00	n.b.	1:1,1	jedoch 2 Jahre
	9	1	0,72	6,0	19458	34103	1200	21,80	1:1,2	1:1,3	[illegible]
		2	0,17	1,4	(o)	2116	(o)	4,88	0	0	[illegible]
		7	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

ZKÜ = 100000 g Sediment des Kulturüberstandes
ZMS = Mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

Tabelle 9: Reverstase-Einbau bei hyperzellulärer ALL vom T-Zelltyp, ausgedrückt in DPM/10 µl und pmol TMP/10^8 Zellen. Rechte Spalte drückt das Verhältnis von Reverstase zu DNA-Polymerase aus, wobei PA gleich 1 gesetzt wurde. Für den 3d (N.R., G.H.) und 6d (N.R.) nach Kultivierung mußten theoretische Nullwerte aufgrund erhöhter Nullwerte eingesetzt werden.
ZÜS = 100000g Sediment des Zellkulturüberstandes
ZMF = mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

Diagnose	Pat.	Tage Kultur in d	Zellzahl gesamt $\cdot 10^8$	Zellzahl pro 10 µl $\cdot 10^6$	Reverstase in DPM/10 µl ZÜS	Reverstase in DPM/10 µl ZMF	Reverstase in pmol TMP/10^8 Z ZÜS	Reverstase in pmol TMP/10^8 Z ZMF	RT:PA in DPM/10 µl ZÜS	RT:PA in DPM/10 µl ZMF
T-Zell-ALL	N.R. ♀	0	2,97	0,21	n.b.	24756	n.b.	4,58	n.b.	1:1,6
		1	4,25	0,38	898	7816	0,06	3,78	1:10,0	1:1,8
		3	1,74	0,15	7332	4261	2,40	1,40	1:5,2	1:2,8
		6	0,36	0,03	5701	72104	4,82	69,5	1:5,5	1:1,4
T-Zell-CLL	G.H. ♀	0	0,26	0,01	n.b.	39170	n.b.	16	n.b.	1:1,79
		1	0,95	0,06	248	1061	0,10	5,41	1:[illegible]	1:8,2
		3	0,14	0,01	1347	4910	4,75	12,38	1:1,4	1:1,4
[illegible]	D.B. ♂	0	0,30	0,03	n.b.	100	n.b.	0,07	n.b.	1:57,0
		1	11,00	0,73	0	0	0	0	0	0
		6	21,85	1,45	2097	401	0,82	+	1:43,0	0
[illegible]		0	13,50	1,03	n.b.	196	n.b.	+	n.b.	0
		1	18,90	1,23	85	0	+	0	0	0
		6	7,47	0,52	0	440	0	+	0	1:272,0

Tabelle 4: Revertase-, DNA-Polymerase- und terminale Transferase-Einbauten in pMol ^{3}H-TTP/10^{8} Zellen im Zellkulturüberstand und Zellkultursediment von Kontrollpersonen.
Als Revertase ohne terminale Transferase-Verunreinigung ist die Spalte Δ errechnet.

n.b. = nicht bestimmt

Person	Tage Kultur in d	Zellzahl gesamt $\cdot 10^{8}$	100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes				Mitochondriale Fraktion der kultivierten Zellen			
			dA	rA	Δ	dpT_g	dA	rA	Δ	dpT_g
T. ♀	0	1,70	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,14	0,60	0,06	0,01
	3	1,12	0,08	0	0	0	0,72	0,48	0,40	0
L. ♀	0	2,00	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,24	0,04	0,01	0
	3	1,41	1,08	0	0	0	0,07	0,28	0,32	0,14
[illegible] ♂	0	1,70	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,42	0,22	0	0,27
	3	1,50	2,77	0,06	0,06	0	0,17	0,11	0,11	0
	7	3,90	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,09	0,04	0	1,00
[illegible] ♂	0	5,38	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0	0	0	0
	3	4,47	+	0	0	+	0,01	0	0	0
	7	4,00	0	0	0	0,07	0,23	0	0	0,05
[illegible] ♂	0	5,05	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0	0	0	0
	3	0,95	0	0,02	0,01	0,04	0,59	0,01	0	0,04
	7	1,50	0,13	0,10	0,03	0,15	1,77	0	0	0

Tabelle 5: Enzymbestimmungen bei Mycosis fungoides-Patienten in pmol ^{3}H-TMP/10^{8} Zellen. Es werden je nach Zellkulturüberstand und Zellkultursediment die gemessenen Einbauten von poly rA, poly dA und dpT_9 miteinander verglichen. Keine Bestimmung bei Patientin L.R. ohne Kultivierung

n.b. = nicht bestimmt
Δ = Differenz aus rA-dpT_9

ZKÜ = 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes
ZKS = mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

Patient	Tage Kultur in d	Zellzahl Gesamt $\cdot 10^{8}$	100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes					Mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen				
			dA	rA	Stat.	Δ	dpT_9	dA	rA	Stat.		dpT_9
L.R.	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
♀	1	0,09	2,90	0,65	–	0,65	0	3,91	0,01	+	0	0,42
	5	0,06	22,00	9,87	–	8,80	1,07	4,11	0	–	0	4,66
	14	0,12	2,17	2,85	–	2,85	0	1,07	1,30	–	0	2,16
A.G.	0	1,53	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	19,00	23,00	+	9,00	14,00
♂	1	3,44	48,00	54,00	+	10,00	44,00	53,00	50,00	+	0	53,00
	2	0,91	0,10	0	–	0	0,25	0	0,68	–	0,68	0
	7	0,95	0,23	0,15	+	0,15	0	0,57	0,30	+	0	0,47
D.T.	0	0,78	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	23,00	22,00	+	10,00	12,00
♀	1	0,72	14,00	12,00	+	2,00	10,00	27,70	21,5	+	8,00	13,00
	2	0,17	0,37	0	–	0	12,50	0	4,0	–	0	10,00
	7	0,91	0,62	0,32	+	0,10	0,22	0,67	0,43	+	0	1,00

Tabelle 6: Enzymbestimmungen bei hyperzellulärer T-Zell-ALL im Zellkulturüberstand und -sediment. Es werden die Einbauten in pMol/10^8 Zellen von poly rA, poly dA und dpT_9 miteinander verglichen.
In den Klammern sind die Versuchsdaten und die vorgenommenen Medienwechsel ausgewiesen.

n.b. = nicht bestimmt

Δ = Differenz aus rA-dpT_9 (Revertaseeinbau ohne terminale Transferaseverunreinigung

Patient	Tage Kultur in d	Zellzahl gesamt $\cdot 10^8$	100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes					Mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen				
			dA	rA	Stat.	Δ	dpT_9	dA	rA	Stat.	Δ	dpT_9
N.E.	0	2,30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	8,56	4,04	+	3,95	0,13
	1	4,15	0,59	0,08	-	0	0,65	1,40	0,78	(+)	0	0,36
♀	3	1,74	12,60	2,40	(+)	0	4,00	4,40	1,40	-	0	3,10
	6	0,34	4,65	4,62	+	4,62	0	9,74	59,40	+	30,00	29,00
C.H.	0	[illegible]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	27,00	15,00	+	12,00	4,00
♀	1	[illegible]	1,48	0,01	-	0,01	0	3,35	0,41	(+)	0,42	0
	3	0,14	7,23	4,75	+	0	4,85	16,00	12,00	+	7,00	5,11
D.B.	0	0,30	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,22	0,00	-	0	0,10
♂	1	11,00	0,14	0	-	0	0	0,57	0	-	0	0
Ersterkrankung	3	11,80	1,08	0,02	+	0,02	(+)	1,56	(+)	(+)	0	(+)
	0	11,60	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,06	(+)	-	0	0,01
[illegible]	1	18,55	0,46	(+)	-	(+)	0	0,06	0	-	0	0
	6	7,97	1,38	0	-	0	0	1,10	0,02	+	0,02	0

Tabelle 7: Vergleich der Hauptstrukturproteine verschiedener Spezies (Vogel, Maus, BLV und HTLV)

Lokalisation und Eigenschaften	Vogel	Maus	BLV	HTLV
Hauptstrukturprotein im Viruskernkörper	p27	p30	p24	p24
Phosphoryliertes Protein des Viruskernkörpers mit spezifischen RNA-bindenden Eigenschaften	p19	p12	p15 p10	
Hydrophobes Protein des Viruskernkörpers	p10	p15	p15 p11	
Hüllprotein, glykosiliert	gp85	gp70	gp60–70	

Tabelle 8: Vergleich der Induktionsgrenzwerte zur Maßnahme der Revertanz von BLV, HFLV und der für unsere Verhältnisse verwendete Ansatz

	Cu^{2+}	Hg^{2+}
BLV	0	5 [illegible]
HFLV	0	10 [illegible]
unser Ansatz	0,5 [illegible]	2 [illegible]

Tabelle 9: Statistische Berechnungen (WELCH-Test)

1. Testgröße

$$t = \frac{1{,}71 \cdot (\bar{x}-\bar{y})}{\sqrt{sx^2 + sy^2}}$$

$\bar{x}$ = Stichprobenmittel des Meßwertes

$\bar{y}$ = Stichprobenmittel des Kontrollwertes

sx^2 = Stichprobenvarianz (Meßwert)

sy^2 = Stichprobenvarianz (Kontrollwert)

2. Der Freiheitsgrad errechnet sich nach:

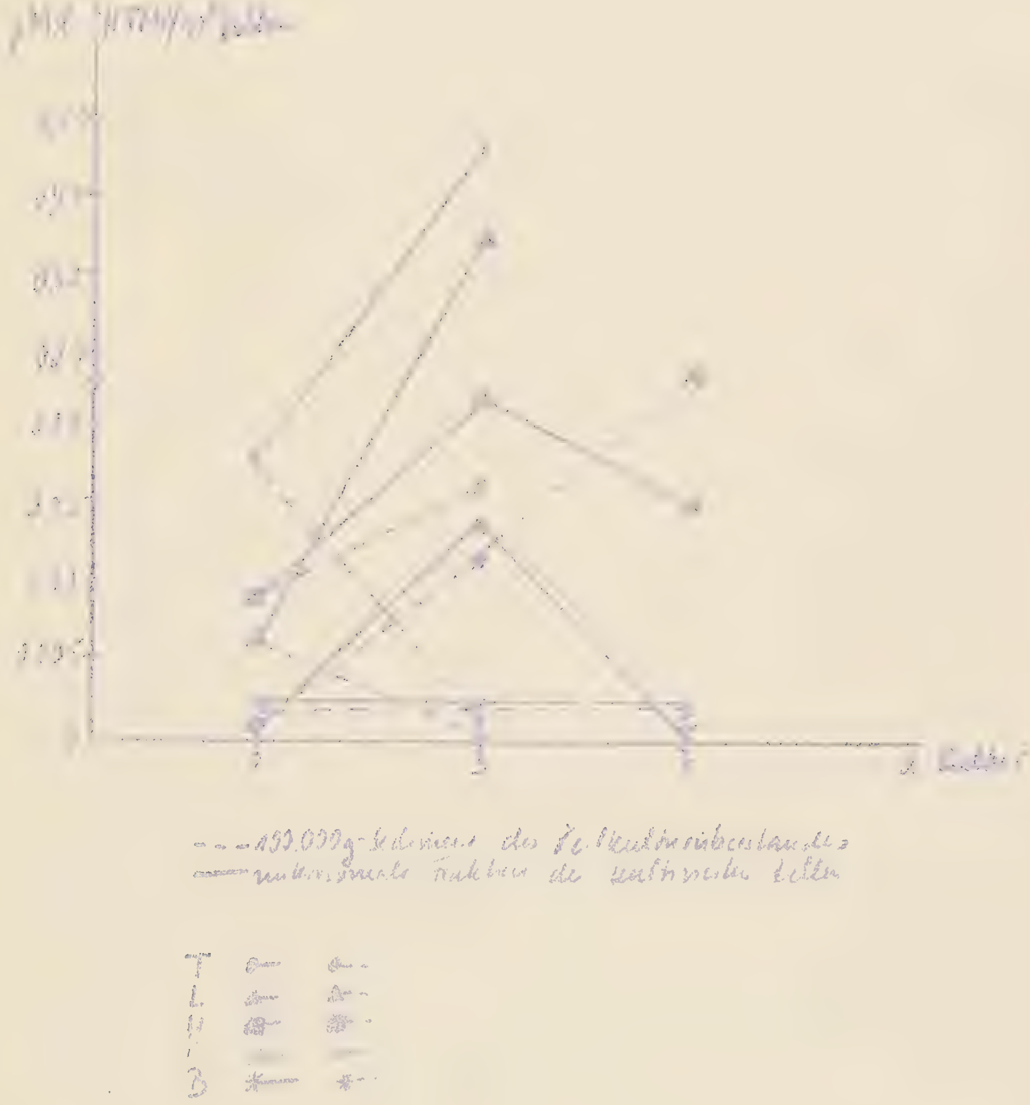
$$f = \frac{(sx^2 + sy^2)^2}{(sx^2)^2 + (sy^2)^2}$$ [illegible]

3. Entscheidung

$t > f$ Ablehnung der Nullhypothese

$t \leq f$ Revertanzverdächtig

$t < f$ [illegible]



[illegible]

Abb. [illegible] [illegible]ivität von Kontrollprobanden nach [illegible] [illegible] [illegible]

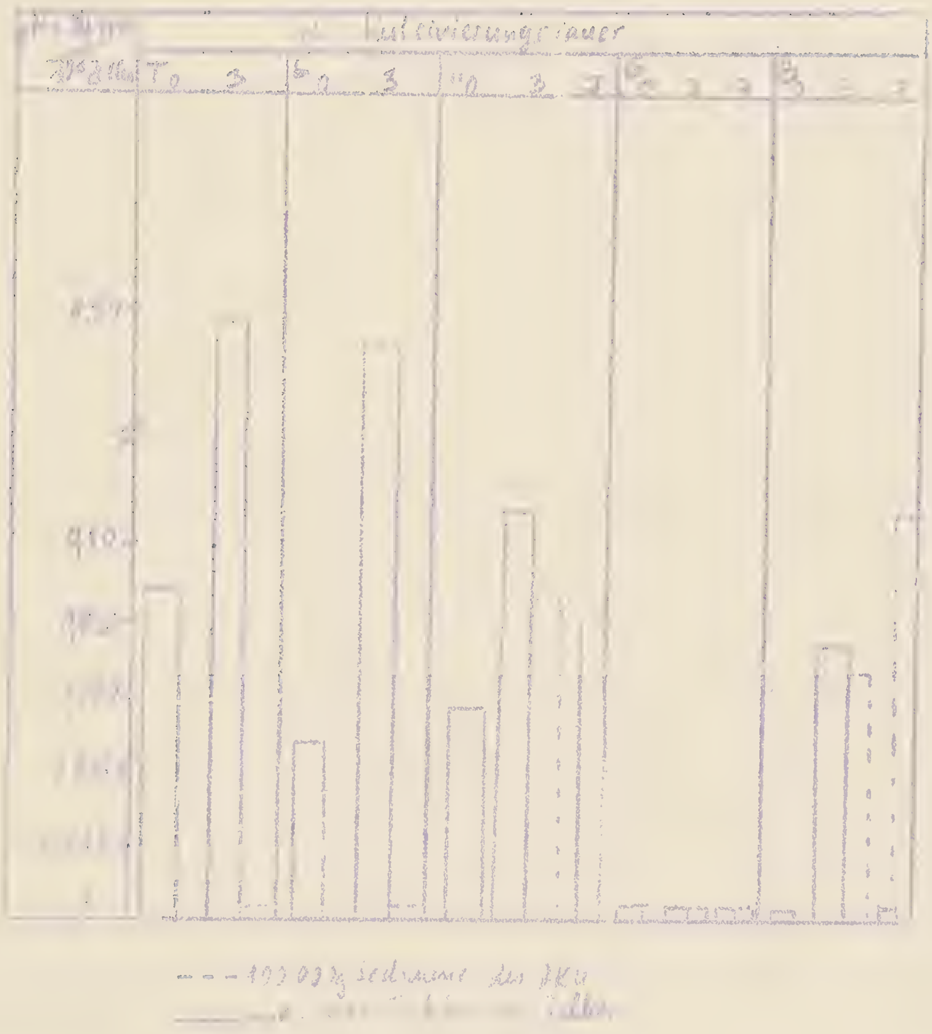


Abb. 2: Reverstaseaktivität von Kontrollproben nach Hitzeinaktivierung. Verhalten von 100000 g sediment des Zellkulturüberstandes und der mikrosomalen Fraktion des Zellsedimentes

Abb. 21: Verteilung [illegible] im [illegible] Saccharose-Dichte-gradienten aus dem Lysat weißer Blutzellen eines Probanden aus der Kontrollgruppe (S.)

Abszisse: Fraktionen 1 bis 10 des Gradienten von je 1-2 ml

Ordinate: rechts = TMP-Einbau in DPM aus ^{3}H TTP im säure-unlöslichen Niederschlag

—— = DNA-Polymeraseaktivität

..... = Reverstaseaktivität im Ansatz 1

links = Dichte der jeweiligen Fraktionen in g/cm^3

Aufarbeitung des Zellpools siehe Material und Methoden. Proband(in) 9 der Kontrollgruppe weist Reverstaseaktivität im Gradienten auf.

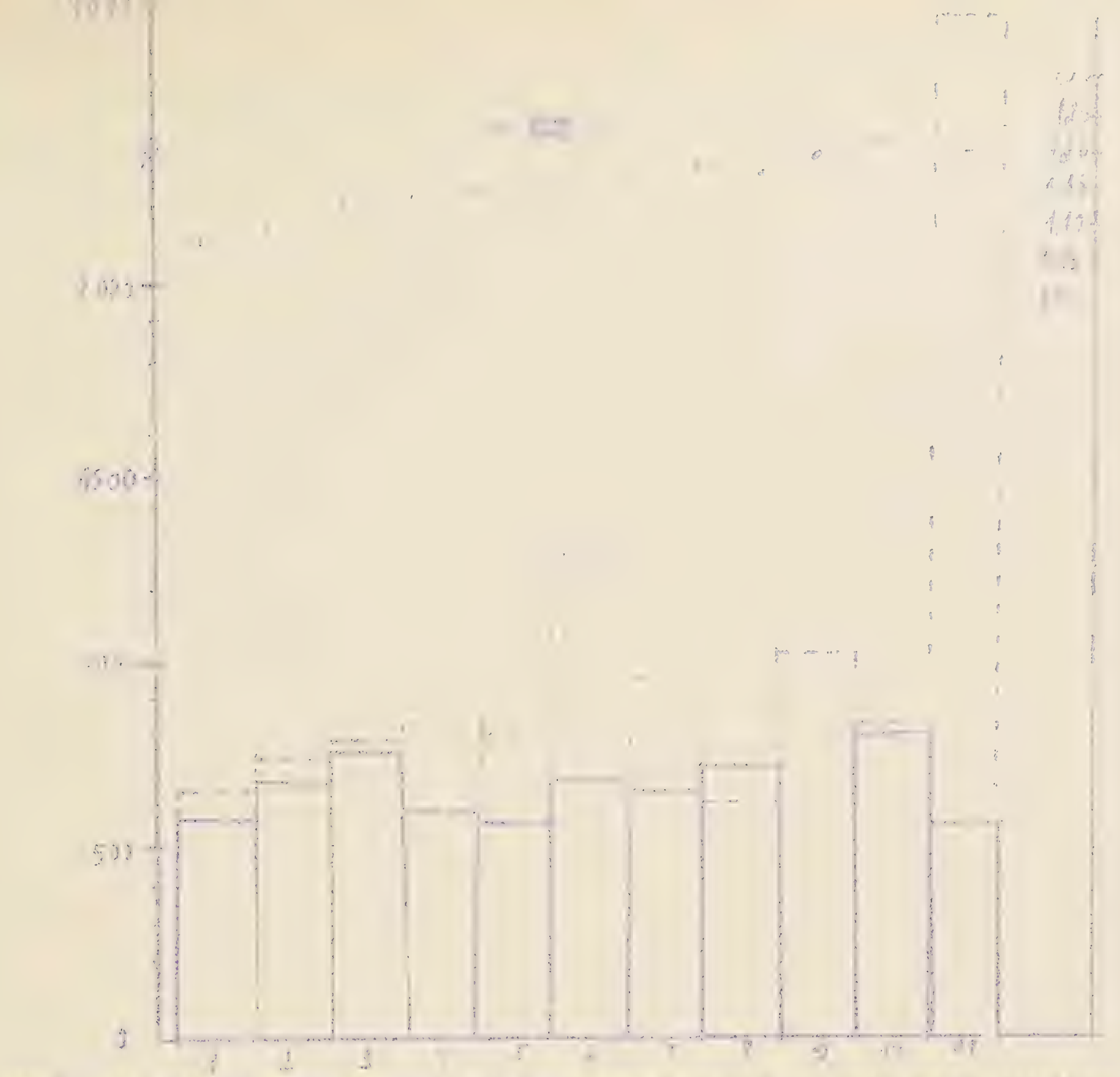


Abb. 4: Virusreinigung im isopyknischen Saccharose-Dichtegradienten aus dem Lysat weißer Blutzellen einer Probandin aus der Kontrollgruppe (G.)

Abszisse: Fraktionen 1 bis 11 des Gradienten von je 1-2 ml
Ordinate: rechts = TMP-Einbau in CPM aus ^{3}H TTP im säureunlöslichen Niederschlag

---- = DNA-Polymeraseaktivität

____ = Reverstaseaktivität in Ansatz 2

links = Dichte der jeweiligen Fraktionen in g/cm^3

Aufarbeitung des Zellysates siehe Material und Methoden. Probandin G. der Kontrollgruppe weist Reverstaseaktivität im Normalbereich auf.

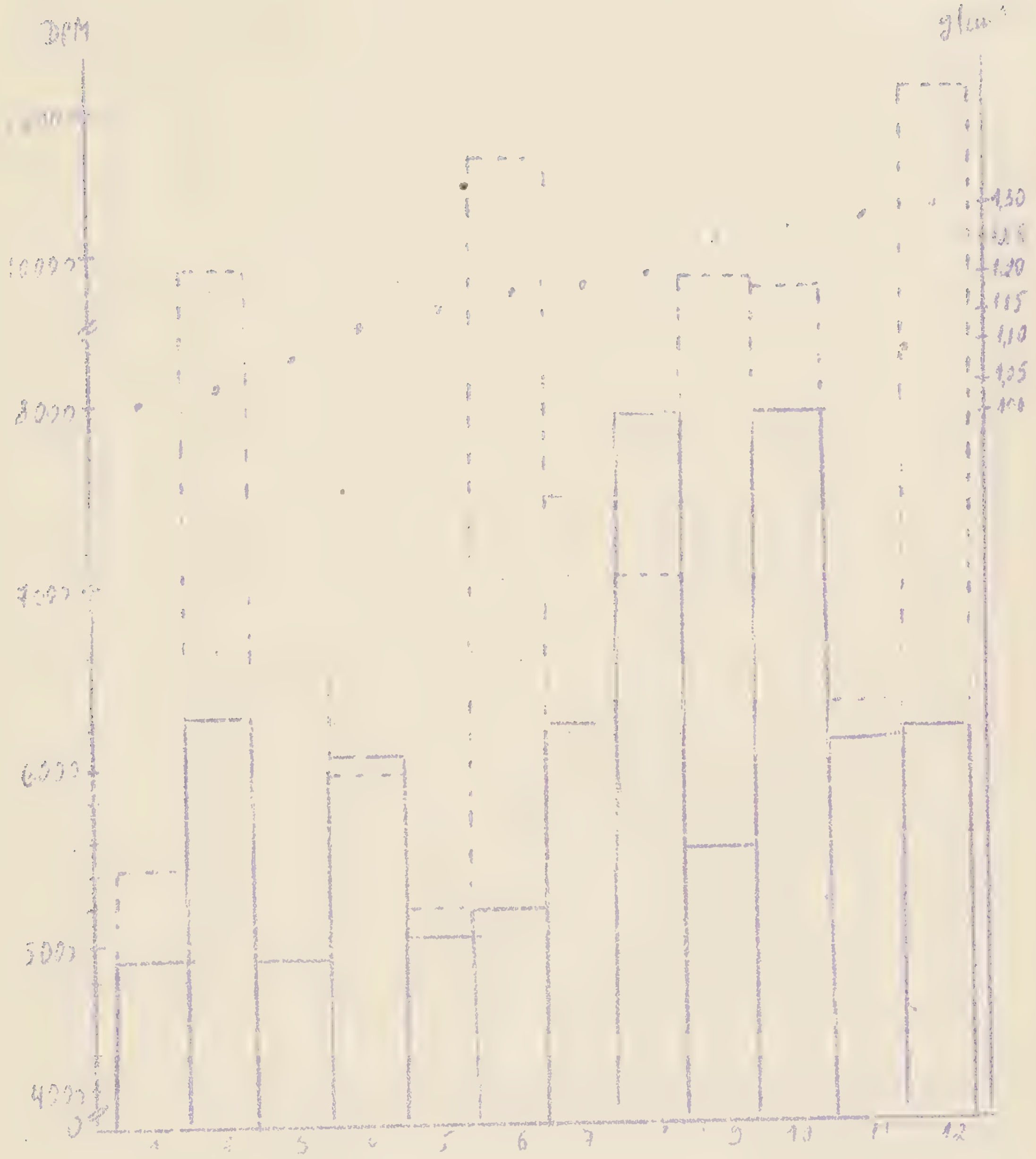


Abb. [illegible]: Virus-Dichte-Gradientenzentrifugation in 20-60 % Saccharose-TNE von Lymphozyten ohne Kultivierung ($2,8 \cdot 10^9$) des Patienten N.R.

Reverstaseaktivität in DPM in 12 Fraktionen vom 100000 g Sediment des Kulturüberstandes der jeweiligen Dichte bestimmt.

Abb. 4: [illegible]gradientenzentrifugation im linearen 5-60 % [illegible]-TNE-Gradienten. Bestimmung der Revertase-Aktivität (___) und DNA-Polymerasen (----) in 12 Fraktionen [illegible] 100000 g Sediment des ZKÜ nach [illegible]zentrifugation von Lymphozyten des Patienten H.B. nach 6 d Kultivierung ($2?8 \cdot 10^{6}$ Zellen).

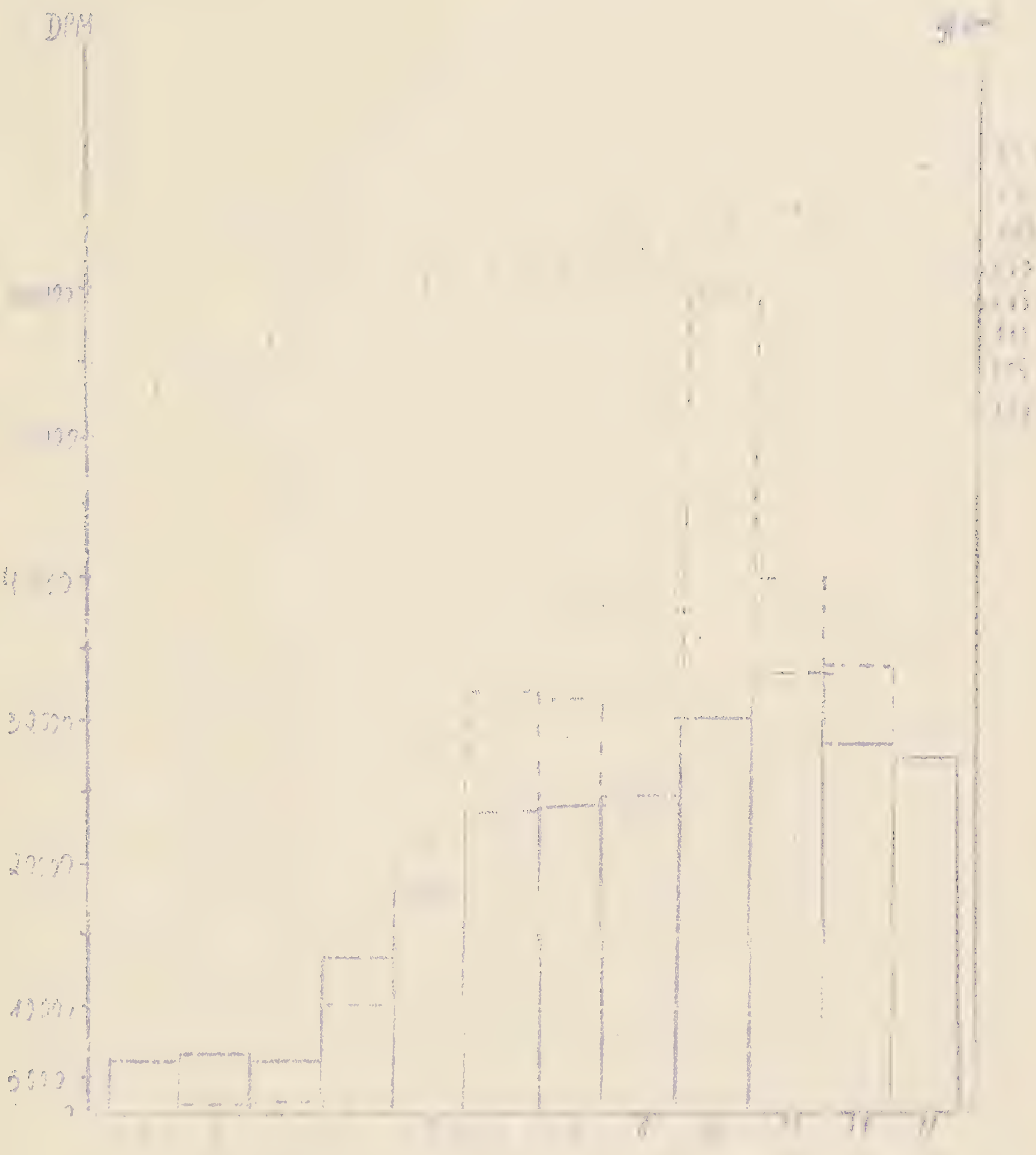


Abb. 2: [illegible] Saccharose-Dichte-Gradienten von Lymphozyten-Sediment nach 6 d Kultivierung des [illegible] ([illegible] Zellen)

[illegible]- und DNA-Polymerase-Bestimmung in 12 Fraktionen der Dichte 1,05-1,35

--- mikrosomale Fraktion der Zellen

— 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes

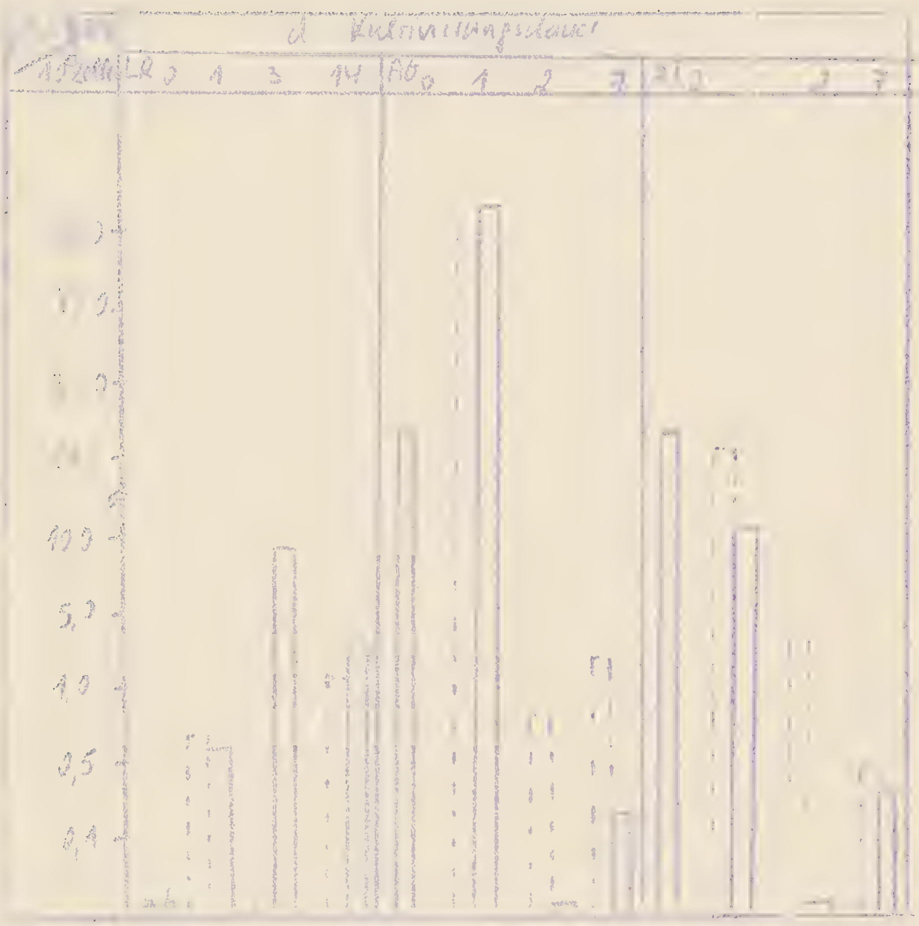


Abb. 61: Reverstranskriptase im 100000 g Sediment des Kulturüberstandes und der mikrosomalen Fraktion der Zellen nach Kurzzeitkultivierung von Leukozyten dreier Patienten mit Mycosis fungoides

---- mikrosomale Fraktion der Zellen

—— 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes

Abb. 8: Verhalten der Enzymaktivität im 15000 g Sediment des Zellkulturhomogenates und der mikrosomalen Fraktion der induzierten Zellen nach [illegible] [illegible] von [illegible] des [illegible] u.a.

— mikrosomale Fraktion der induzierten Zellen

---- 15000 g Sediment des Zellkulturhomogenates

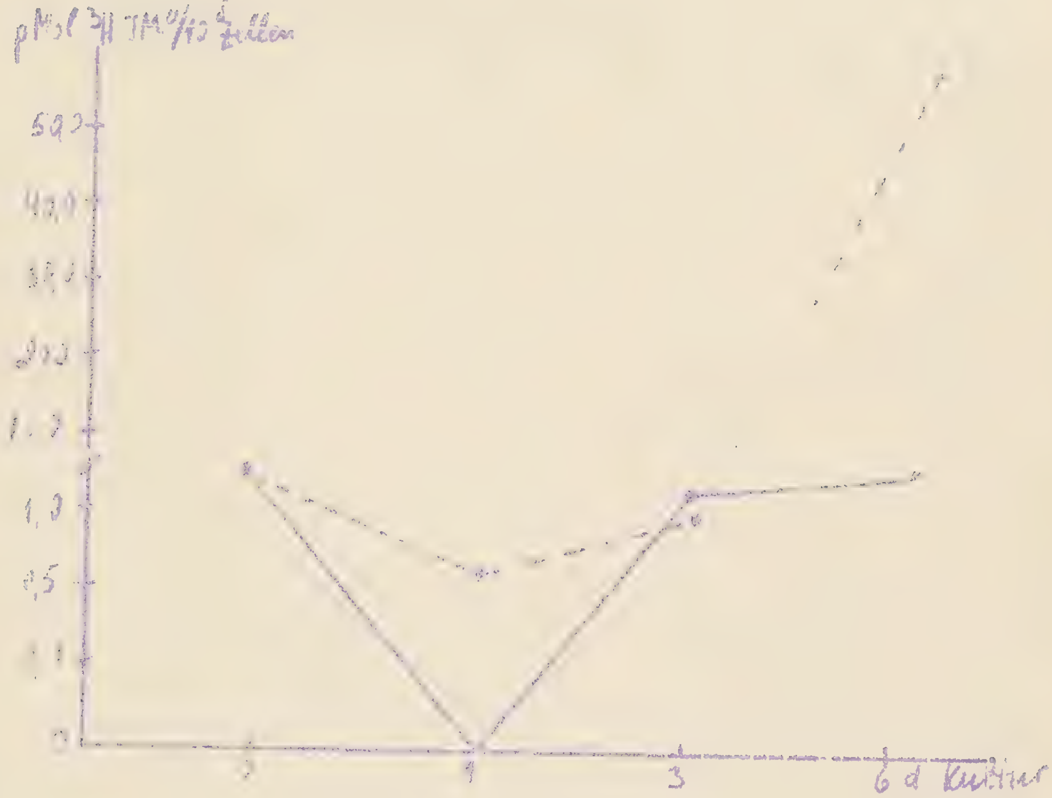


Abb. 10: Revertaseaktivität nach Kurzzeitkultivierung der weißen Blutzellen von Patient H.B. im 100000 g-Sediment des Zellkulturüberstandes und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen.

- - - - mikrosomale Fraktion

——— 100000 g Sediment des ZKÜ

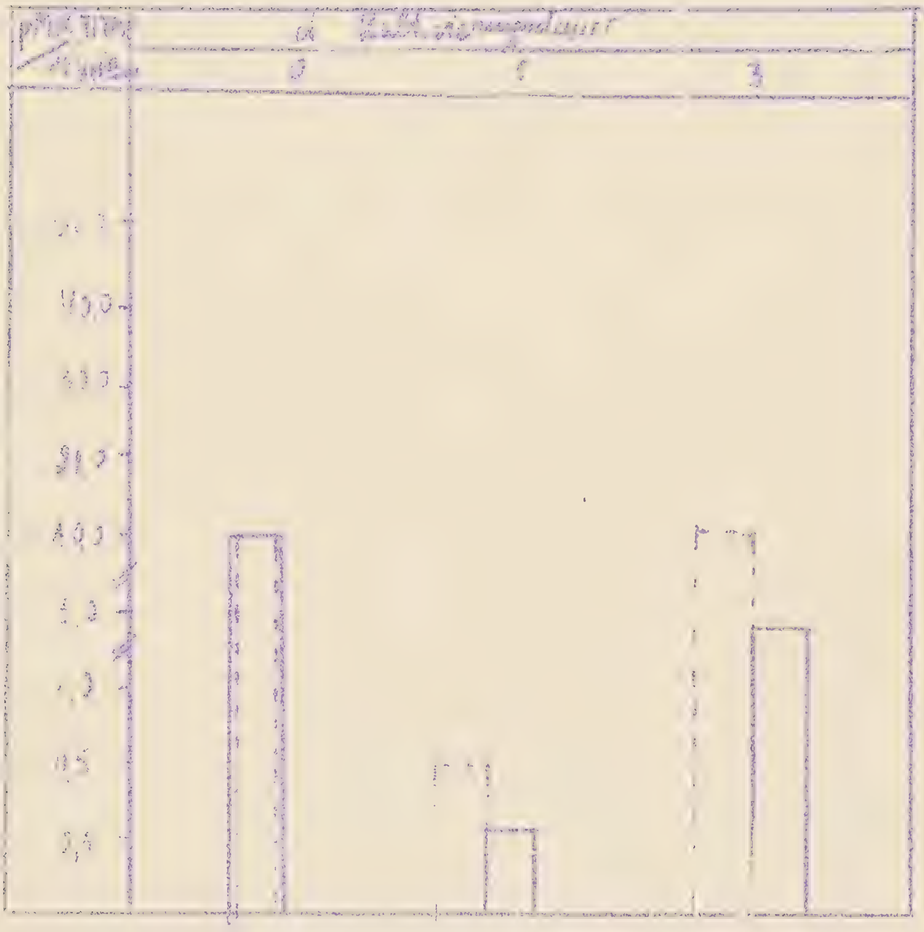


Abb. [illegible]: Reverttaseaktivität nach Kurzzeitkultivierung im 100000 g Sediment des ZKÜ und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen von Leukozyten des Patienten C.H.

--- mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

—— 100000 g Sediment des Kulturüberstandes

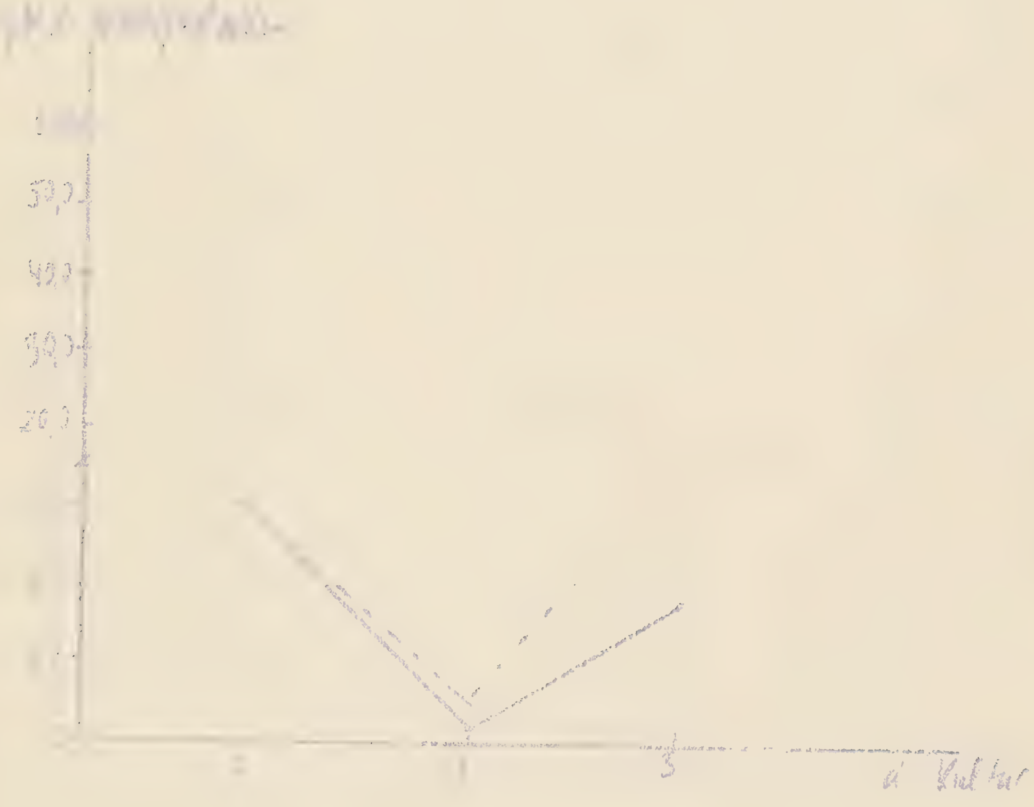


Abb. 12: Verhalten der Saccharase-Aktivität im 100000 g Überstand des Kulturmediums (——) und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen (----) vom Patienten C.H.

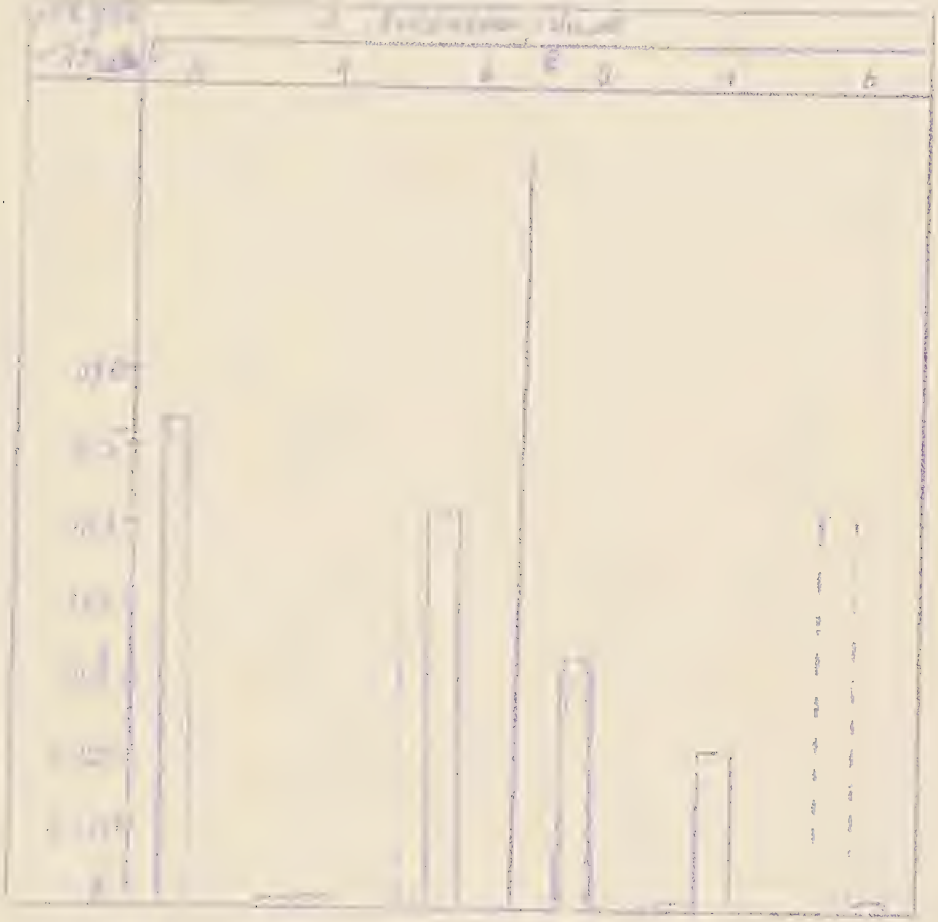


Abb. 13: Verhalten der Revertase-Aktivität im 100000 g Sediment und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen von Patienten D.S. bei der Ersterkrankung und im Rezidiv

—— mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

----- 100000 g Sediment des Kulturüberstandes

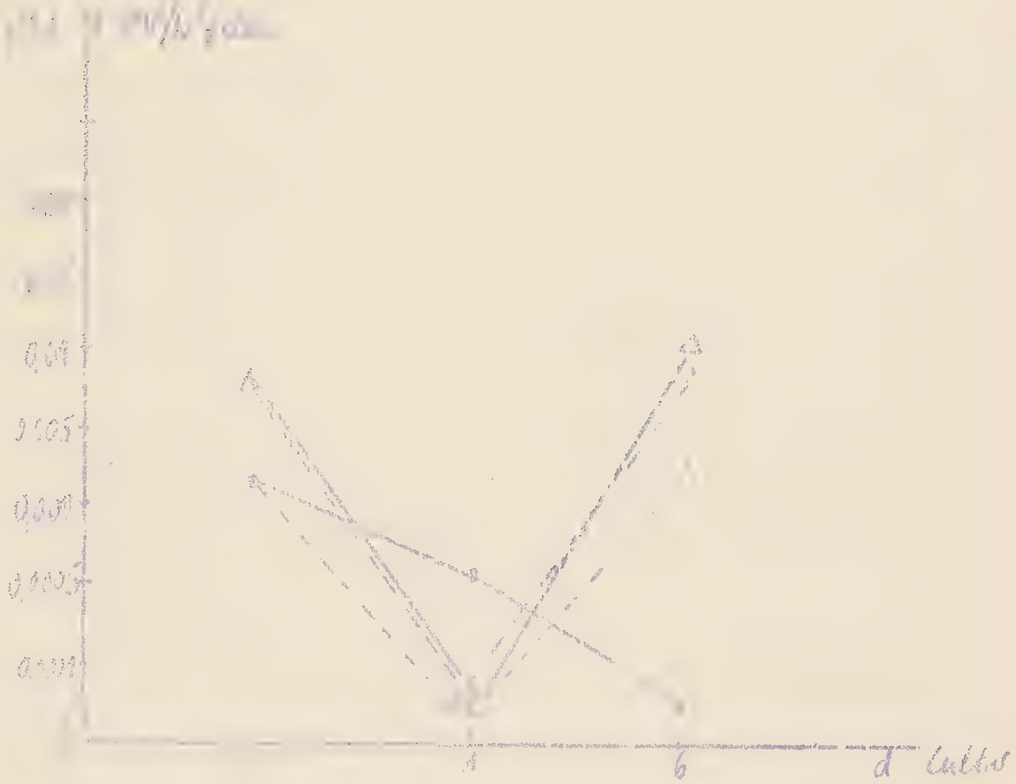


Abb. 34: [illegible] Zellen nach Kurzzeitkultivierung im 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes und in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen bei der Ersterkrankung und im Rezidiv vom Patienten D.B.

— mikrosomale Fraktion der kultivierten Zellen

----- 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes

○ Ersterkrankung (PB)

● Rezidiv (Liquor)

D a n k s a g u n g

Mein herzlichster Dank für die selbstlose Unterstützung, Verständnis und aufgebrachte Geduld bei der Anfertigung dieser Arbeit gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr.sc.med. Sinaida Rosenthal. Ihr ist der Dank auszusprechen, daß diese Arbeit abgeschlossen werden konnte.

Frau Dr.rer.nat. Helga Rößler und Herrn Dr.rer.nat. Bernd Drescher danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und für die unentbehrliche Durchsicht des Manuskriptes mit wertvollen Hinweisen.

Fräulein M. Saddowski und Frau H.Riedel sei für die technische Unterstützung bei den Versuchen gedankt.

Für die Auswahl der Patienten aus der Hautklinik der Charité und für das großzügige Entgegenkommen und Interesse während der Durchführung dieser Arbeit danke ich ganz besonders Frau Prof. Dr.sc.med. H.Albrecht-Nebe.

Frau OA Dr.med. M.Schöntube trug mit der Bereitstellung der Leukapherese-Proben der drei Patienten aus der II.Kinderklinik Berlin-Buch wesentlich dazu bei, diese Arbeit zu realisieren. Ihre hilfreichen Hinweise und ihr Verständnis für die Problematik ermöglichten nicht nur die Versuche, sondern auch manchmal notwendig gewordene Wiederholungen. Meinen herzlichen Dank spreche ich hiermit aus.

Für die zuverlässige und aufwendige Durchführung der Kultivierung, sowie der Bereitstellung von Kulturmedium danke ich verbindlichst Frau K.Albrecht und Frau Hecht des immunologischen Labors der II.Kinderklinik Berlin-Buch.

Ich versichere an Eides Statt, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln durchgeführt zu haben.

Thesen zur Dissertation

[illegible] und [illegible] Nachweis
der [illegible]-abhängigen DNA-Polymerase bei Mycosis fungoides
[illegible]

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-med. Maria [illegible]-Schipnel
geb. am: [illegible]

Dekan: Prof.Dr.sc.med.H. David

Gutachter: 1.

2.

3.

Berlin, [illegible]

Thesen

1. Die vielfach diskutierte und experimentell bei Tieren begründete virale Entstehung der Leukosen wird durch den Nachweis von Viren und viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase erhärtet.

Mittels des exogenen Revertasetestes konnten wir bei einer Reihe Patienten mit verschiedenen leukämischen Krankheitsbildern einen Anstieg [illegible] Normalbereich zeigen. Neueste Arbeiten von amerikanischen und japanischen Arbeitsgruppen sind einem Virus auf der Spur, welches von menschlichen T-Zellen produziert wird (das sogenannte HTLV) und endemisch, in bestimmten Regionen der Karibik und Japan, eine Häufung von Leukosen hervorruft.

2. Aufgrund dieser Ergebnisse versuchten wir zu prüfen, ob mittels des exogenen Revertasetestes bei Patienten mit T-Zell-Lymphomen ein Hinweis auf die Existenz von Viruspartikeln beigebracht werden kann. Wir beobachteten, daß in Lysaten peripherer Lymphozyten von Patienten mit ALL, AML, AMML, CLL und CML die Revertaseaktivität unter Verwendung von poly rA als exogene Matrize signifikant erhöht war. Die Revertasebestimmung war durch parallele Matrizen der DNA-Polymerase und terminalen Transferase verifiziert worden.

3. Wir bezogen in der zweiten Etappe dieser Studien T-Zell-Lymphome mit ein. Im Dichtegradienten wurde geprüft, ob Revertaseaktivität und Partikeldichte korrelieren und ob ein Einfluß der Kurzzeitkultivierung im homologen Serum auf die Revertaseaktivität und Partikelfreisetzung nachgewiesen werden kann.

4. Die Kontrollgruppe bestand in der ersten Serie von Versuchen ohne Kurzzeitkultivierung aus 6 Medizinstudenten. In der zweiten Serie bestand die Kontrollgruppe aus 5 zufällig ausgewählten Probanden im Alter von 14 bis 42 Jahren ohne leukämische Anamnese.

5. In der zweiten Serie wurde das Zellmaterial von T-Zell-Lymphom (Mycosis fungoides) und T-Zell-ALL einer Kurzzeitkultivierung unterzogen, um eine Virus-"Produktion" bzw. -Anreicherung zu erzielen. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob die vorhandene Revertaseaktivität auf Viren, deren Sedimentationsdichte der der Retroviren entspricht, zurückzuführen ist.

Parallel zum Untersuchungsmaterial wurden Kontrollproben ebenfalls kurzzeitkultiviert und einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Als Kultivierungsmedium wurde homologes Human-Nabelschnurserum von Neugeborenen eingesetzt.

6. Beim exogenen Revertasetest wird eine exogene Matrize, ein Polyribonukleotid, zugegeben, die bevorzugt von den RNA-abhängigen DNA-Polymerasen abgelesen wird. Die Proben werden in einem Medium vorinkubiert, welches u.a. das Detergens Triton X-100, KCL, Tris-HCL enthält, um die virale Membran zu lysieren. Ein Aliquot dieses Lysates wird mit einem Reaktionsgemisch gemischt und inkubiert, welches in einem Puffer die Matrize poly rA/oligo dT, das Substrat ^{3}H-TTP, divalente Kationen und ein reduzierendes Agens (DTT oder MET) enthält. Die Reaktion wird mittels Säurefällung gestoppt, der Niederschlag auf Membranfilter abgetrennt und ungebundenes ^{3}H-TTP aus dem Filter gewaschen. Die Radioaktivitätsmessung im Flüssigkeit-Szintillationsgerät ergibt die Einbauwerte in DPM.

7. Durch die isopyknische Dichtegradientenzentrifugation wird der Nachweis erbracht, daß die Revertase eine virus-gebundene Aktivität ist. Retroviren vom Typ C findet man im Allgemeinen bei einer Dichte von 1,14-1,18 g/cm^3.

Nach der Gewinnung des virushaltigen Sedimentes wird 1 ml davon (in TNE-Puffer aufgenommen) auf einen linear geschichteten 20-60 % Saccharose-TNE-Gradienten aufgetragen und zentrifugiert. Von den 12 Fraktionen werden anschließend der prozentuale Zuckeranteil und die Revertaseaktivität bestimmt.

8. Um die Aussagekraft des Saccharose-Dichtegradienten zu bekräftigen, wurde ^{3}H-Uridin nach Kurzzeitkultivierung eingebaut. Das ^{3}H-Uridin wird von der Zelle aufgenommen und intrazellulär zu den Triphosphaten phosphoryliert. Aus dem UTP wird ^{3}H-UMP in die RNA eingebaut. Die virale RNA-Aktivität wurde dann in DPM ausgedrückt. Der ^{3}H-Uridin-Einbau erfolgte bei einem Patienten mit einer T-Zell-ALL und bei einer Kontrollprobandin.

9. Der poly rA-abhängige Einbau von ^{3}H-TMP betrug bei den Kontrollprobanden ohne Kurzzeitkultivierung zwischen 0 und 0,43 pMol ^{3}H TMP/10^{6} Zellen. Ein Proband der Studentengruppe zeigte einen auffälligen Einbau von 1,15 pMol. Von diesem wurden die Zellextrakte weiter untersucht. Nach der Berechnung des 2 s-Bereiches wurde eine obere Grenze von 0,44 pMol ^{3}H TMP/10^{6} Zellen festgelegt. Dieser Grenzbereich wurde durch die Ergebnisse der zweiten Kontrollgruppe nicht überschritten.

Nach Kurzzeitkultivierung wurde kein Anstieg der Aktivität festgestellt. Der Grenzwert wurde von einer Probe mit 0,46 pMol/10^{6} Zellen überschritten, was zu vernachläßigen ist.

10. In der ersten Serie wurde die Revertaseaktivität von 7 Patienten verschiedener Leukoseformen mit dem optimierten Revertasetest ohne Kurzzeitkultivierung gemessen.

Im Normalbereich lagen die Werte von einem Patienten mit einer Panmyelophthise (keine Leukose) und von zwei der drei CLL-Patienten. Die poly rA-abhängigen Einbauten der Patienten mit einer CML (n=2), einem Patienten mit einer CLL und einer ALL waren deutlich über den Normbereich erhöht.

Die Revertaseaktivität bei den Patienten mit Mycosis fungoides bzw. T-Zell-ALL (zweite Serie) ohne Kurzzeitkultivierung war beträchtlich hoch - 23,0; 22,0; 0,65 pMol/10^{6} Zellen (M.F.) und 4,04 - 15,0 (T-Zell-ALL). Nach der Kurzzeitkultivierung stiegen die Werte an, um nach längerer Kultivierungsdauer

wieder abzufallen (M.F.), bzw. etwas abzufallen, um dann wieder anzusteigen (T-Zell-ALL). Insgesamt beobachteten wir hohe Revertase-Aktivität in beiden Krankheitsgruppen, die nach Kurzzeitkultivierung den Ausgangswert nicht überschritten haben.

11. Die freigesetzten Viren befinden sich, falls vorhanden, im Zellkulturüberstand. Wir haben Revertaseaktivität auch im Sediment bzw. in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen gefunden. Auch hier sind die Ausgangswerte ohne Kultivierung viel höher als nach 7 Tagen Kultivierung, sowohl bei den Mycosis fungoides - Proben, wie auch bei der T-Zell-ALL. Es besteht die hohe Wahrscheinlichkeit, daß es sich hier um Vortäuschen der Revertaseaktivität durch zelluläre DNA-Polymerasen, vor allem γ, handelt. Es wäre jedoch auch möglich, daß sich in den Zellen viele virale Partikel befinden, die diese Aktivität hervorrufen.

12. Zellysate dreier Kontrollprobanden, ein Proband hatte 1980 einen erhöhten poly rA-abhängigen Einbau mit 1,13 pMol/10^8 Zellen, wurden einer isopyknischen Dichtegradient-zentrifugation unterzogen, um virale Partikel auszuschließen. Bei zwei Probanden wurde kein Anstieg der R-Aktivität im für Retroviren charakteristischen Bereich von 1,14-1,18 g/cm^3 gesehen. Ein Proband zeigte dagegen einen Gipfel im verdächtigen Bereich. Nach Kurzzeitkultivierung bestätigten sich die Gipfel in den Fraktionen mit 1,10 und 1,16 g/cm^3. Nach zwei Jahren wurde der Dichtegradient bei diesem Probanden ein drittes Mal durchgeführt. Es wurden erhöhte Einbauten in den Dichten 1,04, 1,16 und 1,20 g/cm^3 gefunden. Der Proband hat aus uns unbekannter Ursache einen gesteigerten ^{3}H-TMP-Einbau in den Dichtefraktionen, die für Viruspartikel charakteristisch sind. Zur biologischen Bedeutung dieses Ergebnisses kann von uns noch nichts gesagt werden. Weitere Untersuchungen stehen noch aus.

13. Leider stand uns von den Patienten mit Mycosis fungoides nur wenig Zellmaterial zur Verfügung. Aus diesem Grunde konnten wir keine Dichtegradientenzentrifugation durchführen.

Bei den T-Zell-ALL-Patienten führten wir ohne und nach Kurzzeitkultivierung Dichtegradientenzentrifugationen in 20-60 % Saccharose-TNE durch.

Die Gradienten ohne Kurzzeitkultivierung zeigten bei einem Patienten keinen Gipfel des poly rA-abhängigen Einbaus, bei den anderen fand sich ein deutlicher Anstieg der R-Aktivität im Bereich von 1,16 und 1,25 g/cm^3. Der R-Peak ist eindeutig ein für Retroviren charakteristischer Bereich und läßt sich deutlich vom D-Peak (poly dA-abhängige Einbau-Gipfel) unterscheiden.

Nach Kurzzeitkultivierung zeigten sich mehrere Gipfel der R-Aktivität bei beiden obengenannten Patienten, unter anderem bei 1,15-1,16 und 1,17-1,19 g/cm^3. Ein deutlicher Gipfel wiederholte sich im Bereich von 1,23 g/cm^3, was auf Core-Partikel und anderweitig an Zellstrukturen gebundene Enzymaktivität zurückgeführt werden kann.

14. Der ^{3}H-Uridin-Einbau nach Kurzzeitkultivierung wurde bei einer Kontrollprobandin und einem Patienten mit einer T-Zell-ALL durchgeführt. Die gemessene Radioaktivität bei der Kontrollprobandin war im Dichtebereich von 1,15-1,16 g/cm^3 deutlich geringer, als in anderen Dichtebereichen, sowohl im 100000 g Sediment des Kulturüberstandes, wie auch in der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen.

Bei Patienten mit einer T-Zell-ALL stellten sich im 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes erhöhte ^{3}H-Uridin-Einbauten bei Dichten von 1,09, 1,18-1,21 und 1,25 g/cm^3 dar. In der mikrosomalen Fraktion der kultivierten Zellen ist nur ein Dichtebereich (1,18 g/cm^3) deutlich hervorgehoben.

neben 1,10, 1,23 und 1,26 g/cm^3, die höchstens halb so hohe Einbauten zeigten. Es wäre möglich, daß im 100000 g Sediment des Zellkulturüberstandes inkomplette Viruspartikel vorliegen, die in höheren Dichtebereichen sedimentieren. Der Anstieg in der mikrosomalen Fraktion ist im Vergleich zur Kontrollprobandin im 1,16 g/cm^3 - Dichtebereich deutlich erhöht. Wahrscheinlich wurde unter diesen Kultivierungsbedingungen keine Virusfreisetzung erreicht.

13. Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Revertaseaktivität der Proben von drei Patienten mit Mycosis fungoides sprechen dafür, daß Retrovirus-Partikel vorliegen könnten. Von insgesamt 20 gemessenen Proben sind 13 hinsichtlich der R-Aktivität eindeutig erhöht, ein Wert liegt im Grenzbereich und nur 6 Werte (=30 %) befinden sich im "Normbereich".

Bei den T-Zell-ALL-Patienten haben wir aufgrund elektronenoptischer Aufnahmen im Pathologischen Institut der Charité sichere Hinweise auf das Vorhandensein eines Virus, jedoch fehlen noch immunologische und weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Absicherung und Vervollständigung der Befunde.

Von den insgesamt 12 gemessenen Proben lagen nur drei (=25 %) im "Normbereich", die restlichen neun Werte sind signifikant erhöht. Wir konnten keine nennenswerte Steigerung der Revertaseaktivität, mit Ausnahme einer Probe, nach durchgeführter Kurzzeitkultivierung erzielen. Die Kultivierungsbedingungen sind offensichtlich für unsere Fragestellung, Virusproduktion und -freisetzung, nicht optimal ausgewählt. Mit dem Einsatz von Nabelschnurserum allein konnten die Zellen nicht zur Virusproduktion angeregt werden.

14. Wir konnten aufgrund der vorliegenden Arbeit schlußfolgern, daß es sich bei Mycosis fungoides-Patienten und den Patienten mit einer T-Zell-ALL um eine Infektion mit

einem Typ-C-Retrovirus handelt. Der Beweis für das HTLV muß noch erbracht werden.

17. An erster Stelle weiterer Untersuchungen steht die Etablierung einer virusproduzierenden Zellinie, die ausreichend Virusmaterial für die Charakterisierung des Virus liefern würde.

Der Einsatz von Mitogenen, sowohl B- und T-Zellmitogene, wie auch Phythämagglutinin und Concavalin A, ist eine der Möglichkeiten reinere und größere Virusfraktionen nach Kultivierung zu erhalten.

Transmissionsstudien in vitro, ein geeignetes Tiermodell und der Einsatz von Vergleichsserien würden über das Wirtsspektrum Aufschluß geben und den Beweis für das Vorhandensein eines HTLV liefern.

Die Weiterführung dieser Arbeit hat insbesondere für die frühzeitige Diagnostik für T-Zell-Lymphomen/Leukämien und den rechtzeitigen Einsatz einer wirkungsvollen Therapie Bedeutung. Unter dieser Sicht ist eine enge Zusammenarbeit klinischer und experimentell-theoretischer Einrichtungen erforderlich.